

**Die Rolle von Membran-Mikrodomänen und des GPI-geankerten
Moleküls CD24 bei der Regulation der Zelladhäsion**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

genehmigte

Dissertation

(D386)

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Kerstin Krauß

Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 19.10.2000

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 24.05.2000
Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 19.10.2000

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Altevogt

Danksagung

Diese Arbeit entstand von Oktober 1997 bis September 2000 am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg in der Abteilung Zelluläre Immunologie des Forschungsschwerpunktes Tumorummunologie.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Peter Altevogt danken. Er stellte mir ein äußerst interessantes Thema zur Verfügung, war immer ansprechbar und diskussionsbereit und hat mich während der ganzen Zeit hervorragend betreut.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer für die Bereitschaft, diese Arbeit vor der Fakultät für Chemie der Universität Kaiserslautern zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. Volker Schirmacher danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes in seiner Abteilung und die anregenden Diskussionen in Seminaren.

Herrn Dr. Herbert Spring danke ich für die große Hilfe mit dem Laser-Scanning-Mikroskop. Herzlicher Dank gilt Herrn Klaus Hexel für die kompetente Hilfe bei der FACS-Analyse und für die vielen Stunden des Zellsortings.

Allen Mitgliedern der Abteilung Zelluläre Immunologie danke ich für die freundschaftliche und hilfsbereite Atmosphäre; die Arbeit hat immer sehr viel Spaß gemacht.

Bedanken möchte ich mich bei den Kollegen meiner Arbeitsgruppe: Paul Gutwein, Safwan Jouma, Sabine Mechtersheimer, Dr. Matthias Oleszewski, Christine Schlösser und Alexander Stoeck und allen, die das DKFZ bereits verlassen haben. Herrn Paul Gutwein danke ich besonders für die Hilfe in allen Fragen der Molekularbiologie.

Großer Dank gilt meinen Eltern, auf deren Unterstützung ich mich immer verlassen kann. In diesem Sinne danke ich auch Christine und Carsten.

Von ganzem Herzen danke ich Udo, für die Liebe.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung

1. „Rafts“-Mikrodomänen in der Zellmembran	1
1.1 Biologische Membranen und Rafts	1
1.2 Die Komposition der Rafts	3
1.3 Die Existenz von Rafts in vivo	5
1.4 Die funktionelle Bedeutung der Rafts	6
2. CD24 – ein GPI-geankertes Zelladhäsionsmolekül	9
3. Die Integrin-Familie der Zelladhäsionsmoleküle	11
4. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	15

B. Material und Methoden

I. Zellbiologische und tierexperimentelle Methoden

1. Zelllinien	16
2. Zellkulturbedingungen	17
2.1 Zellkultur	17
2.2 Bestimmung der Zellzahl	17
2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	17
3. Versuchstiere	17
4. Naive Zellen	18
4.1 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus Organen	18
4.2 Knochenmarkskulturen nach Whitlock-Witte	18
4.3 Stimulation von T-Zellen durch ConA	19
4.4 Stimulation von B-Zellen mit LPS	19
4.5 Ernten von ConA- bzw. LPS-Blasten	19
5. Infektion von Zellen mit Adenoviren	20
6. Transfektion von Zellen	21
6.1 Transfektion mit FuGene	21

6.2 Transfektion mit Superfect.....	21
6.3 Transfektion durch Elektroporation	21
7. Zellbindungsversuche	22
8. Transmigrationsversuche	24
9. Cholesterin-Depletion	24
10. PI-PLC-Behandlung von Zellen.....	25
11. Durchflußzytometrie	25
11.1 Immunfluoreszenz-Färbung für die FACS-Analyse	26
11.1.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	26
11.1.2 Direkte Immunfluoreszenzfärbung	26
11.2 Fixation von Zellen nach der Immunfluoreszenzfärbung	27
11.3 Immunfluoreszenzfärbung zum Zellsort	27
12. Laser-Scanning-Mikroskopie	27

II. Biochemische Methoden

1. Antikörper	28
1.1 Monoklonale Antikörper.....	28
1.2 Polyklonale Antikörper	29
1.3 Sekundärantikörper	29
2. Reinigung von Antikörpern	29
3. Kopplung von Antikörpern an Fluoreszenz-Farbstoffe	30
3.1 Kopplung von Antikörpern an FITC.....	30
3.2 Kopplung von Antikörpern an Cy3.....	30
4. Aufreinigung von Antigen mittels Affinitätschromatographie	31
4.1 Herstellung einer Affinitätssäule	31
4.2 Aufreinigung von Antigen	31
5. ELISA	32
6. SDS-PAGE	33
7. Western Blot	35
8. Präparation von DIGs.....	36
9. Präparation von Membran- und Zytosolfraktionen.....	37
10. Proteinfällung.....	38
11. Proteinbestimmung nach Bradford	38
12. In vitro-Phosphorylierungsexperimente	38

III. Molekularbiologische Methoden

1. PCR.....	40
2. Auftrennung von PCR-Produkten im Agarose-Gel	41
3. Restriktionsverdau von DNA.....	41
4. DNA-Fällung mit Ethanol.....	42
5. Umklonierung von DNA-Fragmenten zwischen zwei Vektoren	42
5.1 Ausschneiden der DNA aus einem Vektor	42
5.2 DNA-Isolation aus einem Agarose-Gel	43
5.3 Ligation von DNA-Fragmenten	43
5.3.1 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten	43
5.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten	43
6. Herstellung transmembraner CD24-Konstrukte	44
7. Transformation von Bakterien	45
7.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation durch Hitzeschock	45
7.2 Transformation kompetenter Bakterien durch Hitzeschock	46
8. Präparation von Plasmid-DNA	47
8.1 Minipräparation von Plasmid-DNA.....	47
8.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	48
9. Bestimmung der DNA-Konzentration	49

C. Ergebnisse

1. Die Rolle der Rafts bei der Regulation der Zelladhäsion.....	50
1.1 Antikörper gegen CD24 induzieren die Bindung von Thymozyten an ICAM-1	50
1.2 Die CD24 induzierte Adhäsion ist vermittelt durch LFA-1	52
1.3 Antikörper gegen transmembrane Moleküle können LFA-1 nicht aktivieren	53
1.4 CD24 und LFA-1 kolokalisieren in den Membranrafts	55
1.5 Raft-Vernetzung induziert Bindung über LFA-1	58
1.6 CTx induziert das Clustern von LFA-1 auf der Zelloberfläche	60
1.7 Die Aktivierung von LFA-1 über Raft-Clustering unterscheidet sich von der PMA-induzierten Bindung	61
1.8 Raft-Clustering induziert die Tyrosin-Phosphorylierung von pp16/18.....	63
1.9 Cholesterin-Depletion verhindert die Aktivierung von LFA-1 durch Raft-Clustern	65

1.10 Raft-Integrität ist Voraussetzung für die basale Bindungsfähigkeit von aktivierten T-Zellen.....	67
2. Die Funktion des CD24 in Membran-Rafts	69
2.1 CD24 ^{+/+} Zellen binden besser an FN40 als CD24 ^{-/-} Zellen.....	69
2.2 18H18-Revertanten verlieren die Fähigkeit zur Bindung an FN40	71
2.3 Die Bindung der Zellen wird vermittelt durch das α_4 -Integrin	72
2.4 PMA restauriert den Bindungsdefekt von CD24 ^{-/-} Zellen	72
2.5 Die Zellen unterscheiden sich auch in der Migration	73
2.6 Untersuchungen an Knochenmarks präB-Lymphozyten.....	74
2.7 CD24 und α_4 lokalisieren in den Rafts	75
2.8 Die Rafts sind essentiell für die Bindung von CD24 ^{+/+} Zellen	77
2.9 Die Bindung von CD24 ^{-/-} Zellen kann durch externe Gabe von löslichem CD24 rekonstituiert werden	79
2.10 Der Einbau des löslichen CD24 erfolgt in die Rafts	81
2.11 Die Bindung der CD24 ^{-/-} Zellen läßt sich durch CD24-enhaltende DIGs restaurieren	82
2.12 Die Rekonstitution des Bindungsvermögens ist spezifisch für CD24	85
2.13 PI-PLC-Behandlung reduziert die Bindung von CD24 ^{+/+} Zellen.....	87
2.14 Die Bindung von CD24 ^{-/-} Zellen kann durch verschieden glykosylierte Formen von CD24 rekonstituiert werden.....	89
2.15 Herstellung von transmembranen CD24-Konstrukten.....	90

D. Diskussion

1. CD24 als „Raft“-Molekül	93
2. Die Rolle der Rafts bei der Regulation der Zelladhäsion	94
3. Raft-Clustern induziert eine Signalkaskade in den Zellen.....	97
4. Raft-Clustern involviert das Zytoskelett	101
5. Affinität versus Avidität	102
6. Die physiologische Relevanz des Raft-Clusterns in der Zelladhäsion.....	103
7. Die Rolle von CD24 bei der Regulation der Integrinaktivität	107
8. Ausblick	114

E. Zusammenfassung.....	115
--------------------------------	------------

F. Literatur	116
---------------------------	------------

G. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis.....	132
2. Publikationsliste.....	135
3. Lebenslauf.....	136
4. Erklärung.....	137

A. Einleitung

1. „Rafts“- Mikrodomänen in der Zellmembran

1.1 Biologische Membranen und Rafts

Membranen, die sich auf der Oberfläche und im Inneren aller lebenden Zellen befinden, erfüllen Funktionen, die für die Unversehrtheit und Aktivität der Zellen und Gewebe von großer Bedeutung sind. Die erste Funktion der Zellmembranen ist die Bildung von Kompartimenten. Die äußere Zellmembran grenzt das Zellinnere vom umgebenden Milieu ab, und im Zellinneren dienen Membranen der Abtrennung von Funktionseinheiten, den sog. Organellen. Die Kommunikation der Zelle mit dem externen Milieu wird durch Pumpen und Kanäle gewährleistet, die spezifisch Substanzen gegen einen elektrochemischen Gradienten transportieren, oder deren Passage über einen solchen Gradienten übernehmen. Spezifische Rezeptoren erkennen externe Signale.

Membranen bestehen fast ausschließlich aus Lipiden und Proteinen. Die meisten Membranproteine zeigen enzymatische Aktivität, so z. B. die Flavoproteine und die Cytochrome auf der Innenseite der Mitochondrienmembran, die mit dem aktiven Transportmechanismus verbundene ATPase sowie die Adenylatcyclase. Wichtige nichtenzymatische Membranproteine sind z. B. spezifische Ionenkanäle, Membranrezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle.

Die Membranlipide sind kleinere und einfacher gebaute Moleküle als die Membranproteine und lassen sich in drei Gruppen unterteilen: Die Phosphoglyceride sind durch ein Glycerinrückgrat gekennzeichnet, die Sphingolipide haben ein Rückgrat aus Sphingosinbasen. Diese beiden Molekülklassen sind amphipatisch, d. h. sie haben polare Köpfe und nicht-polare Schwänze. Die polaren Gruppen sind hydrophil, die unpolaren Gruppen sind hydrophob. Die duale Natur dieser amphipatischen Membranlipide ist wichtig für die Organisation der biologischen Membranen, denn die polaren Köpfe dieser Moleküle suchen die Nähe des Wassers, während sich die unpolaren Schwänze gegenseitig anziehen und durch van-der-Waalsche Kräfte miteinander verbinden. Als Folge dieser Eigenschaften bilden sie in wässriger Lösung eine Doppelschicht. Dieses Konzept gilt als Grundlage für die Struktur biologischer Membranen: sie bilden eine Lipid-Doppelschicht, in der Membranproteine eingelagert sind. Die dritte Gruppe der Membranlipide umfaßt die Sterine, deren Hauptvertreter das Cholesterin ist. Die Sterine sind weitgehend unpolar und lagern sich

zwischen die Kohlenwasserstoffschwänze der Phosphoglyceride und Sphingolipide ein. Dadurch erhöht sich die Viskosität des Kohlenwasserstoffgerüsts der Zellmembran.

Die extrazellulären biologischen Membranen sind nach dem Flüssig-Mosaik-Modell organisiert (Singer und Nicolson, 1972). Dieses Modell geht davon aus, daß einzelne Membranproteine aufgrund des flüssigen Zustandes der Lipidmatrix freibeweglich sind und sich durch Lateraldiffusion in der Zellmembran bewegen.

In den letzten Jahren wurde die Existenz größerer funktioneller Einheiten in der Zellmembran postuliert. Die Gruppe um den Zellbiologen Kai Simons stellte die sog. „Raft-Hypothese“ (Simons und Ikonen, 1997; Harder und Simons, 1997) auf. Das Modell besagt, daß es durch Anziehungskräfte zwischen Sphingolipiden mit gesättigten Kohlehydratketten und Cholesterin zur Formation lateraler Assoziationen in einer Umgebung ungesättigter Glycerophospholipide kommt (Simons und Ikonen, 1997). Diese lateralen Assoziationen auf der Zellmembran wurden als „Rafts“ bezeichnet. Der englische Begriff „Raft“ bedeutet „Floß“ und soll deutlich machen, daß die Rafts als Einheit, wie Flöße auf einem See, in der Zellmembran „schwimmen“ (Abb. 1).

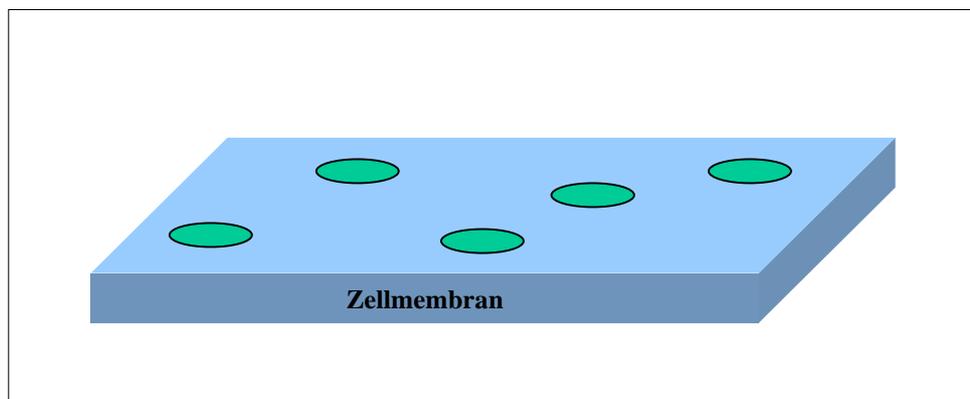


Abb. 1 Stark vereinfachtes Bild der „Rafts“ als Flöße in der Zellmembran.

Das fundamentale Prinzip, nach dem die Rafts Einfluß ausüben, ist die Separation oder Konzentration spezifischer Membranproteine und Lipide in Membran-Mikrodomänen (Harder et al, 1998). Diese Domänen können als Plattformen im Trans-Golgi-Netzwerk für apikales Sorting und als Zentrum zur Rekrutierung und Konzentration von Signal-Molekülen in der Plasmamembran dienen. Simons und Ikonen postulierten 1997 die Existenz der Rafts ausgehend von Studien, die sich mit dem gerichteten Transport in polarisierten Zellen beschäftigten. In polarisierten, epithelialen Zellen unterscheiden sich die apikale und die

basolaterale Membran stark in ihrer Lipid- und Protein-Zusammensetzung (Rodriguez-Boulan und Nelson, 1989). Der Transport vom Trans-Golgi-Netzwerk der Zelle zur apikalen oder basolateralen Plasmamembran wird durch verschiedene Transport-Vesikel vermittelt (Wandinger-Ness et al, 1990; Ikonen et al 1995). Mikrodomänen, die Glycosphingolipide und Cholesterin beinhalten, werden als Plattformen für den apikalen Transport diskutiert (Matter und Mellmann, 1994; Simons und Ikonen, 1997). Einige Zelloberflächenproteine besitzen keinen transmembranen Anteil, sondern sind durch einen sog. GPI- (Glykosylphosphatidyl-Inositol-) Anker mit der Zellmembran verbunden (Hooper, 1997). Aufgrund seiner langen, ungesättigten Kohlenwasserstoffketten assoziiert der GPI-Anker präferentiell mit den Mikrodomänen, was eine Rekrutierung der GPI-geankerten Proteine die in Rafts zur Folge hat (Schröder et al, 1998; Benting et al, 1999). Beim intrazellulären Transport gilt der GPI-Anker als Signalgeber für den apikal-gerichteten Transport (Brown et al, 1989; Lisanti et al, 1989; Harder und Simons, 1997; Muniz und Riezman, 2000). Spezifische Signalsequenzen im zytoplasmatischen Teil von Transmembran-Proteinen steuern in polarisierten Zellen den basolateralen Transport (Müsch et al, 1996; Yoshimori, et al, 1996). Das Modell der Rafts geht davon aus, daß die Transportmodule, die aus dem Zellinneren kommen, mit der Zellmembran verschmelzen und in ihr als funktionelle Einheit erhalten bleiben. In epithelialen, polarisierten Zellen akkumulieren die Rafts an der apikalen Zelloberfläche, in unpolarierten Zellen können basolaterale und apikale Marker sich frei auf der Zelloberfläche verteilen (Harder et al, 1998).

1.2 Die Komposition der Rafts

Rafts stellen funktionelle Einheiten dar, die sich strukturell von der homogenen Fläche der Zellmembran abheben. Sie sind hochangereichert mit bestimmten Sphingolipiden, Cholesterin, einigen transmembranen Proteinen, Signal-transduzierenden Molekülen und GPI-geankerten Molekülen (Varma und Mayor, 1998; Friedrichson und Kurzchalia, 1998; Ilangumaran et al, 2000; Brown und London, 2000). Schon früh beschrieben Cinek und Horejsi (1992), daß GPI-geankerte Moleküle in der Zellmembran von Lymphozyten als funktionelle Komplexe mit Signalmolekülen assoziieren. Das Vernetzen von GPI-geankerten Molekülen induziert die Tyrosin-Phosphorylierung von verschiedenen Substraten im Zellinneren (Brown, 1993). In T-Zellen ist die zur *src*-Familie der Tyrosin-Kinasen gehörende Kinase *lck* zum größten Teil mit den Rafts assoziiert (Rodgers und Rose, 1996). In Jurkat-

Zellen ist das Signaling durch das GPI-geankerte Molekül CD59 stark abhängig von der Integrität der Rafts (Stulnig et al, 1997).

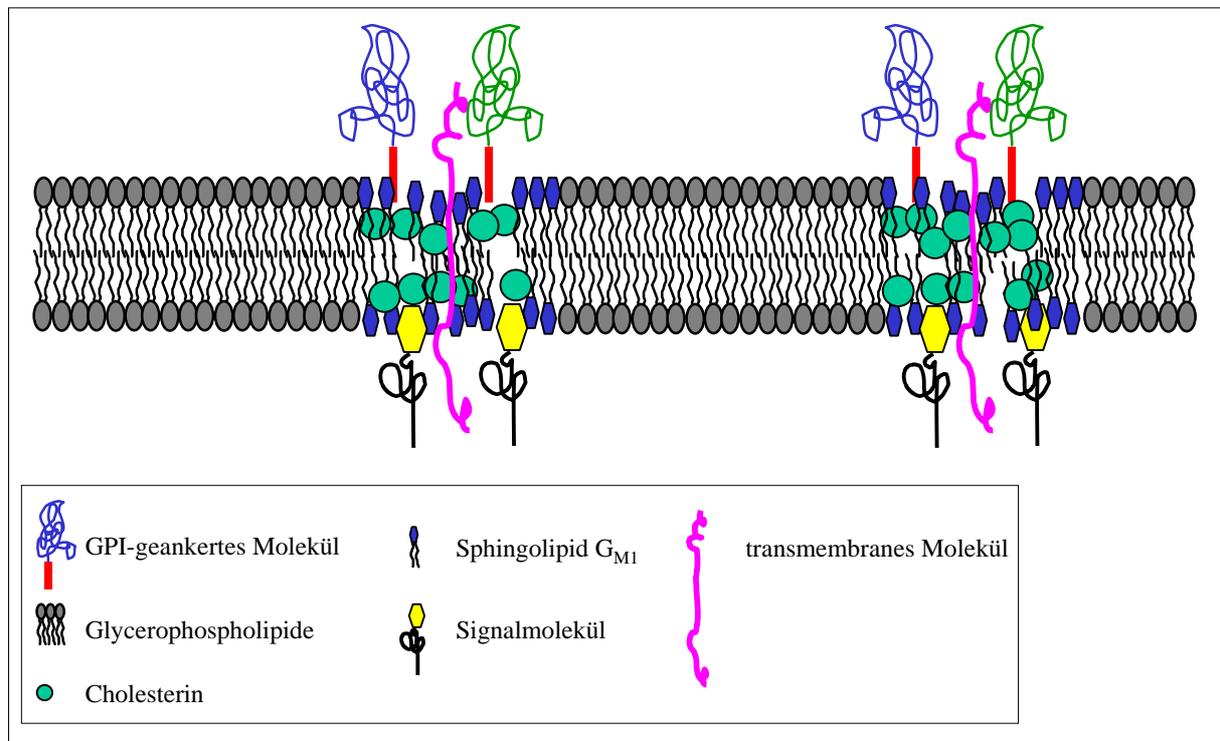


Abb. 2 Rafts in der Zellmembran. Strukturelle Komponenten sind der Legende zu entnehmen.

Die Rafts repräsentieren einen Pool von Signal-transduzierenden Molekülen. Das wichtigste Sphingolipid in den Rafts ist das Gangliosid G_{M1} . Es wird als Raft-Marker bezeichnet (Harder et al, 1998; Viola et al, 1999). Der Cholesteringehalt ist essentiell für die Integrität der Rafts (Rietveld und Simons, 1998). Reduziert man den Cholesteringehalt der Membran durch Inhibitoren der Cholesterin-Neusynthese oder durch Extraktion des vorhandenen Cholesterins aus der Zellmembran, werden die Rafts zerstört und ihre Funktionalität geht verloren (Keller und Simons, 1998; Varma und Mayor, 1998; Friedrichson und Kurzchalia, 1998). Auch einige transmembrane Moleküle können mit den Rafts assoziieren (Varma und Mayor, 1998; Friedrichson und Kurzchalia, 1998; Cinek und Horejsi, 1992). Die Gründe für diese Assoziationen sind bislang nicht in jedem Fall geklärt. Eine mögliche Erklärung ist die reversible Palmitoylierung der Proteine (Rietveld und Simons, 1998; Zhang et al, 1998; Melkonian et al, 1999), obwohl nicht alle palmitoylierten Proteine in Rafts lokalisieren und nicht alle Raft-Proteine palmitoyliert sind. Auch die Sequenz der membrandurchspannenden Domäne kann essentiell sein für die Assoziation von transmembranen Molekülen mit Rafts

(Perschl et al, 1995; Scheiffele et al, 1997; Field et al, 1999). Auch Mutationen im zytoplasmatischen Teil von transmembranen Proteinen, von dem eine direkte Interaktion mit Lipiden eigentlich nicht erwartet würde, können die Assoziation mit Rafts beeinflussen (Puertollano und Alonso, 1998; Polyak et al, 1998; Brückner et al, 1999; Machleidt et al, 2000). Abbildung 2 zeigt alle essentiellen Komponenten von Rafts. Die Rafts erscheinen als funktionelle Einheiten, die sich in der Lipid-Doppelschicht der Membran befinden. Die Lipid-Doppelschicht ist hier stark vereinfacht dargestellt, sie wird als Doppelschicht aus Glycerophospholipiden präsentiert. Die Rafts haben eine Größe von weniger als 70 nm (Jacobson und Dietrich, 1999).

1.3 Die Existenz von Rafts in vivo

Die Frage, ob die Rafts als funktionelle Einheiten auf der Zellmembran tatsächlich existieren, wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. Licht- oder elektronenmikroskopische Analysen sind nicht eindeutig. Zum Teil können Cluster von GPI-geankerten Molekülen auf der Zelloberfläche detektiert werden (Matsuura et al, 1984; Latker et al, 1987; Kobayashi und Robinson, 1991; van den Berg et al, 1995; Anderson, 1998), zum Teil sind die Cluster von GPI-geankerten Molekülen oder anderen Raft-Komponenten nur sichtbar, wenn sie durch einen Zweitantikörper vernetzt werden (Howell et al, 1987; Rothberg et al, 1990; Fra et al, 1994; Mayor et al, 1994; Parton et al, 1994; Fujimoto, 1996; Harder et al, 1998). Die Analysen suggerieren, daß die Rafts in der Zellmembran nicht-polarisierter Zellen in vivo sehr klein und hochdynamisch sein müßten, so daß sie mit den angewandten Mikroskopie-Techniken schwer nachweisbar sind (Edidin, 1997; Harder und Simons, 1997; Simons und Ikonen, 1997; Weimbs et al, 1997, Brown und London, 1998; Jacobson und Dietrich, 1999). Ein Ansatzpunkt zur Analyse der Rafts war deren Unlöslichkeit in nichtionischen Detergenzien wie Triton X-100. Die Rafts können mit Triton X-100 nicht solubilisiert werden und floaten bei der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation nach oben. Diese unlösliche Fraktion wird als DIG- („detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membrane“-) Fraktion bezeichnet und enthält vermutlich die Inhalte aller zellulären Raft-Domänen zusammen (Brown, 1992; Kurzchalia et al, 1995; Parton und Simons, 1995). Die Unlöslichkeit in Triton X-100 hat sich als ein guter Ausgangspunkt zur Analyse der Rafts erwiesen. Die Depletion von Sphingolipiden oder Cholesterin trennt die Assoziation von verschiedenen Proteinen mit der DIG-Fraktion (Cerneus et al, 1993; Hanada et al, 1995; Scheiffele et al, 1997). GPI-geankerte Moleküle assoziieren mit der DIG-Fraktion, wenn sie den biosynthetischen

Transport vom Trans-Golgi-Netzwerk zur Zellmembran vollziehen (Skibbens et al, 1989; Brown und Rose, 1992). Ahmed et al zeigten 1997, daß Detergens-Unlöslichkeit und die Formation geordneter Module aus Sphingolipiden und Cholesterin in einer Lipiddoppelschicht stark korrelieren. Trotzdem ist die Charakterisierung von Rafts durch biochemische Analysen begrenzt. Die Detergens-unlösliche Fraktion der Zellen repräsentiert nicht die aktuelle Organisation der einzelnen Rafts in der Zellmembran, weil sie immer eine Mischung aus allen vorhandenen Rafts darstellt (Mayor und Maxfield, 1995). Harder et al gelang es 1998 durch vergleichende Studien mit Vernetzern für Raft-Proteine und Vernetzern für Nicht-Raft-Proteine die Lipid-Domänen als Cluster in der Zellmembran darzustellen. Im selben Jahr wiesen Friederichson und Kurzchalia durch chemische Vernetzung die Existenz von Mikrodomänen, angereichert mit GPI-gankerten Molekülen, auf der Zelloberfläche nach. In den letzten zwei Jahren gab es immer mehr Studien, die mit Hilfe der FRET-Mikroskopie (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) in vivo die Rafts auf der Zellmembran darstellen konnten (Varma und Mayor, 1998; De Angelis et al, 1998; Kenworthy et al, 2000). Kürzlich gelang es Pralle et al (2000) die Diffusion von Rafts auf der Zellmembran mittels Single-Particle-Tracking genau zu untersuchen. Die Analyse-Techniken wurden immer besser, und man kann davon ausgehen, daß Rafts in der Zellmembran als hochorganisierte Module bestehen.

1.4 Die funktionelle Bedeutung der Rafts

Im Prinzip kann die Assoziation von Proteinen mit Rafts deren Funktion auf zwei Arten beeinflussen. Erstens kann die Konzentration der Proteine in Rafts die homo- und heterophile Interaktion erleichtern. Zweitens kann die geordnete Lipidumgebung, die sich stark unterscheidet von der „normalen“ Struktur der Zellmembran, direkt die Funktion durch eventuelle Konformationsänderungen beeinflussen. Für diese zweite Möglichkeit gibt es bisher keine klaren Evidenzen, außer, daß die Cholesterin-Konzentration und die Doppelschicht-Breite die Orientierung der transmembranen Helix und die Interaktion zwischen den einzelnen Helices angreifen kann (Ren et al, 1997; Ren et al, 1999). Die Depletion von Cholesterin aus der Membran, die zur Zerstörung der Rafts führt (s. o.), verändert die Funktion eines Raft-assoziierten Kaliumkanals (Martens et al, 2000).

Viele verschiedene Ansätze wurden unternommen, um die Funktion der Rafts zu untersuchen. Von verschiedenen Proteinen wurde eine Assoziation mit den Rafts beschrieben, die sehr wichtig ist für die jeweils spezielle Funktionsfähigkeit des einzelnen Proteins. Andere

Ansätze untersuchen funktionelle Komplexe aus Proteinen, bei denen das experimentelle Clustern einer Komponente die Neuverteilung und die Lokalisation der anderen Komponenten in Rafts bedingt. Wichtig sind auch Studien, bei denen z. B. durch Mutationsanalysen gezeigt wird, daß durch den Verlust der Assoziation mit den Rafts in der Zellmembran die Funktionalität eines Moleküls verloren geht (siehe unten). Außerordentlich interessant sind Experimente, bei denen durch Entfernung des Cholesterins aus der Zellmembran die Rafts zerstört werden und somit die Funktionsfähigkeit ganzer Signalwege unterbunden wird (Xavier et al, 1998; Sheets et al, 1999). Jeder dieser Ansätze für sich kann immer auch kontrovers diskutiert werden. So hat die Cholesterin-Depletion sicherlich nicht nur die Zerstörung der Rafts zur Folge, sondern beeinflußt die Komposition und Eigenschaft der gesamten Zellmembran. Die größte Evidenz für eine Funktion der Rafts liegt dann vor, wenn verschiedene experimentelle Ansätze in die gleiche Richtung weisen. Dies wird am besten veranschaulicht im Falle der Funktion von Rafts in der Signaltransduktion in hämatopoetischen Zellen, speziell in T-Zellen.

Bevor dieses Thema ausführlich dargestellt wird, sollen zunächst andere Prozesse bei denen Rafts involviert sind, kurz erläutert werden. Die Rafts wurden als erstes beschrieben als funktionelle Komponenten im Sorting, ausgehend vom Trans-Golgi-Netzwerk (Simons und Ikonen, 1997; Brown und London, 1998; Weimbs et al, 1997; Rodriguez-Boulan und Gonzalez, 1999; Benting et al, 1999), speziell in epithelialen Zellen und Neuronen. Kürzlich konnte eine Beteiligung der Rafts beim Sorting im endozytotischen Weg in CHO-Zellen nachgewiesen werden (Mukherjee et al, 1999). Doch nicht nur in zellulären Sorting-Mechanismen sind Rafts sehr wichtig, Rafts bzw. Raft-assoziierte Moleküle dienen auch als Bindungspartner für verschiedenen Pathogene und Toxine (Fivaz et al, 1999). Außerdem scheinen die Rafts eine wichtige Rolle zu spielen bei der Prozessierung des amyloiden Vorläufer-Proteins (APP) im Gehirn, welches zur Entstehung von Morbus Alzheimer führt (Smart et al, 1999, Kurzchalia und Parton, 1999; Parkin et al, 1999).

Die Funktion von Rafts ist am besten beschrieben in der Signaltransduktion hämatopoetischer Zellen. Obwohl die verschiedenen hämatopoetischen Zellen sehr unterschiedliche Rollen während der Immunantwort spielen, so sind die von ihnen verwendeten Signalwege doch sehr ähnlich. In T- und B-Lymphozyten gibt es Multikomponenten-Komplexe, die die Antigene direkt binden, wohingegen es in anderen Immunzellen zur indirekten Bindung des Antigens durch Antikörper-bindende Fc-Rezeptoren kommt (Ravetch und Clynes, 1998). In jedem Fall führt die Bindung des Antigens zur Vernetzung des Rezeptors, was eine Aktivierung der *src*-Familie der Tyrosin-Kinasen zur Folge hat. Die aktivierten Kinasen phosphorylieren

Tyrosinreste in den zytoplasmatischen Domänen eines oder mehrerer Rezeptoren. Diese Ereignisse initiieren eine Signalkaskade durch die Rekrutierung von untergeordneten Signalproteinen, die in der zellspezifischen Immunantwort endet. Viele der involvierten Signalmoleküle lokalisieren präferentiell in den Rafts. So werden die *src*-Kinasen und das Adaptorprotein fast ausschließlich in den Detergens-unlöslichen Fraktionen von Immunzellen gefunden (Zhang et al, 1998). Die Vernetzung durch Antikörper rekrutiert verschiedene Rezeptoren in die Detergens-unlösliche Zellfraktion, dies gilt für den T-Zell-Rezeptor (Montixi et al, 1998), den B-Zell-Rezeptor (Cheng et al, 1999) und verschiedene Fc-Rezeptoren (Field et al, 1997; Lang et al, 1999). In einigen Fällen führt das Clustern der Rezeptoren zur Umverteilung anderer mutmaßlicher Raft-Marker. Da die Moleküle nicht in direkter Interaktion miteinander stehen, lokalisieren sie wahrscheinlich in derselben Membran-Mikrodomäne, was zur Folge hat, daß eine Umverteilung des einen Moleküls durch Clustern die Umverteilung eines anderen Moleküls bedingt. Dies gilt z. B. für den Fc-Rezeptor und den Raft-Marker G_{M1} (Brown und London, 1998) oder die *src*-Kinase *lyn* (Sheets et al, 1999) auf basophilen Zellen. Genauso führt das Clustern des T-Zell-Rezeptor-Komplexes oder des kostimulatorischen Moleküls CD28 zum Ko-Clustern von G_{M1} an der Kontaktstelle zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle (Viola et al, 1999). Umgekehrt führt das Clustern von G_{M1} auf T-Zellen zum Ko-Clustern des T-Zell-Rezeptorkomplexes und bedingt außerdem eine Konzentration des Adaptorproteins LAT und der *src*-Kinase *lck* (Janes et al, 1999; Harder und Simons, 1999; Janes et al, 2000). Mehrere Studien unterstreichen den funktionellen Einfluß der Rafts auf die Signaltransduktion in hämatopoetischen Zellen (Xavier und Seed, 1999; Ilangumaran et al, 2000). Der Fc-Rezeptor wird mit der gleichen Kinetik wie seine Raft-Rekrutierung durch *lyn* Tyrosin-phosphoryliert, wohingegen der außerhalb der Rafts verbleibende Rezeptor unphosphoryliert bleibt (Field et al, 1997). Die Zerstörung der Rafts durch Cholesterin-Depletion inhibiert die Tyrosin-Phosphorylierung des Antigenrezeptors in T-Zellen (Xavier et al, 1998) und in basophilen Zellen (Sheets et al, 1999). Die gesamte Signaltransduktion durch den T-Zell-Rezeptor wird durch Cholesterin-Depletion unterbunden (Xavier et al, 1998). Durch Cluster des Raft-Markers G_{M1} kann in T-Zellen die Signaltransduktion induziert werden (Janes et al, 1999). Die Funktion von LAT im T-Zell-Rezeptor-Signaling wird vollständig aufgehoben, wenn die Assoziation des Moleküls mit den Rafts durch fehlende Palmitoylierung unterbunden wird (Zhang et al, 1998; Lin et al, 1999). Die Funktion der Rafts in der Signaltransduktion hämatopoetischer Zellen wurde in den letzten Jahren immer deutlicher.

Während der Immunantwort ist nicht nur die intrazelluläre Signaltransduktion von großer Wichtigkeit, sondern auch die Zelladhäsion und alle sukzessiv folgenden Vorgänge wie z. B. die Zellmigration. Die Zelladhäsion wird vermittelt durch Zelladhäsionsmolekülen, die sich in drei Familien einteilen lassen: Die Immunglobulin-Superfamilie, die Selektin-Familie und die Familie der Integrine, die später noch genauer vorgestellt wird. Zelladhäsionsmoleküle müssen, je nach Ereignis, in der Zelle verschieden lokalisiert sein und werden spezifisch reguliert. Die Rafts bieten, aufgrund ihrer Komposition und der hohen Mobilität der Zelle die Möglichkeit, funktionelle Komplexe sehr effizient neu zu verteilen und somit sehr schnell auf Veränderungen zu reagieren, bzw. selbst zu agieren. Bisher konnte eine Assoziation von Zelladhäsionsmolekülen mit den Rafts noch nicht nachgewiesen werden. Allerdings konnte eine Assoziation von β_1 - und β_2 -Integrinen mit Caveolin und eine Lokalisation dieser Zelladhäsionsmoleküle in den Caveolae gezeigt werden (Chapman et al, 1999; Schwab et al, 2000). Caveolae teilen einige Eigenschaften mit den Rafts, sind aber nicht mit den Rafts gleichzusetzen (Brown und London, 1998; Janes et al, 2000). Die Caveolae sind ähnlich strukturiert wie die Rafts, weshalb sie in nicht-ionischen Detergenzien ebenfalls unlöslich sind und sich in der DIG-Fraktion von Zellen ansammeln. Hauptprotein in den Caveolae ist das namensgebende Caveolin. Aufgrund seiner Struktur bewirkt das Caveolin, daß die Caveolae als Invaginationen in der Zellmembran erscheinen (Brown und London, 1998). Für die Assoziation mit Integrinen wurde, ähnlich wie bei der Assoziation der Rafts mit Komponenten des Signalings in Immunzellen, eine Funktion im intrazellulären Signaling nachgewiesen (Chapman et al, 1999; Schwab et al, 2000). Für das Integrin $\alpha_v\beta_3$ wurde die Ausbildung eines Komplexes mit CD47 und G-Proteinen beschrieben, der abhängig ist vom Cholesteringehalt der Zellmembran (Green et al, 1999). Eine Rolle der Rafts im komplexen Vorgang der Zelladhäsion ist also durchaus denkbar, wurde allerdings noch nicht eindeutig belegt. Es konnte aber gezeigt werden, daß die Integrität der Rafts essentiell ist für die Migration der Zelle (Manes et al, 1999), indem sie zur „front-rear“-Bildung bei der Migration der Zelle beitragen.

2. CD24 - ein GPI-geankertes Zelladhäsionsmolekül

Das murine CD24, welches auch als HSA – „heat-stable antigen“ - bezeichnet wird, hat einen Proteinkern von nur 27 Aminosäuren und ist stark glykosyliert (Kay et al, 1990; Wenger et al, 1991). Aufgrund des unterschiedlichen Glykosylierungsmusters variiert das Molekulargewicht je nach exprimierendem Zelltyp von 28 bis 70 kD. CD24 ist mit der

Zellmembran durch einen GPI-Anker verbunden, eine alternative transmembrane Form existiert nicht (Kay et al, 1990; Wenger et al, 1991; Alterman et al, 1990; Rougon et al, 1991; Kadmon et al, 1992).

CD24 wurde ursprünglich als Differenzierungsantigen untersucht, da viele lymphoide Zellen es in unreifen Entwicklungsphasen exprimieren, während die reifen Zellen das Antigen nicht mehr tragen (Bruce et al, 1981; Crispe und Bevan, 1987; Wenger et al, 1993; Shirasawa et al, 1993). Das murine CD24 wird auf den folgenden hämatopoetischen Zellen exprimiert: PräB-Zellen (Bruce et al, 1981), Thymozyten (Crispe und Bevan, 1987), Monozyten, vor ihrer Differenzierung zu Makrophagen (Takei et al, 1981), Granulozyten und Erythrozyten (Takei et al, 1981; Bruce et al, 1981). Mittlerweile konnte gezeigt werden, daß CD24 auch auf aktivierten T- und B-Zellen re-exprimiert wird (Hubbe et al, 1994). Neben der Expression auf hämatopoetischen Zellen findet sich CD24 auch auf neuronalen und epithelialen Zellen (Kadmon et al, 1992). Für das humane Homolog von CD24 wurde eine Expression auf verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen (Huang et al, 1995; Akashi et al, 1994; Jackson et al, 1992; Droz et al, 1990; Karran et al, 1997; Fogel et al, 1999).

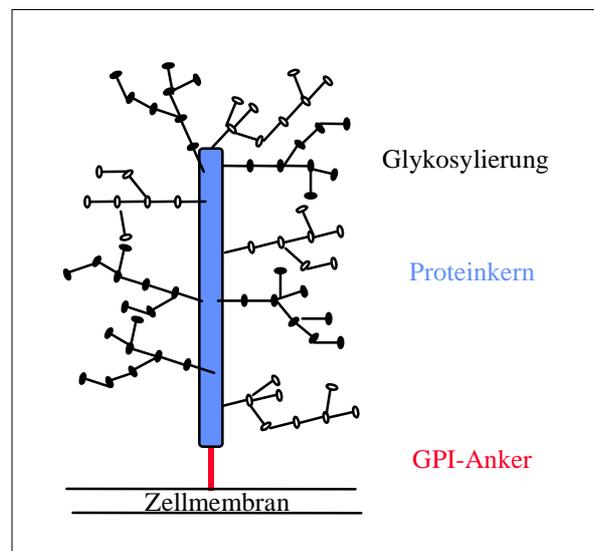


Abb. 3 Modell des stark glykosylierten CD24. Dargestellt ist der Proteinkern und die O- und N- gebundenen Zuckerstrukturen.

Für CD24 sind bisher zwei Funktionen beschrieben: Sowohl das murine als auch das humane CD24 dienen als Ligand für das Zelladhäsionsmolekül P-Selektin (Sammar et al, 1994; Aigner et al, 1995; Aigner et al, 1997). Im humanen System wurde nicht nur die statische Adhäsion nachgewiesen, sondern auch das Rolling von CD24-exprimierenden Tumorzellen

auf P-Selektin (Aigner et al, 1998). Friederichs et al, konnten zeigen, daß CD24 entscheidend involviert ist in die Metastasierung von Tumorzellen (2000, zur Publikation eingereicht). CD24 hat auch Funktionen in der Signaltransduktion. In neuronalen Zellen können Antikörper gegen CD24 einen intrazellulären Ca^{2+} -Einstrom induzieren (Kadmon et al, 1994). In funktionellen Studien wurde gezeigt, daß CD24 auf Antigen-präsentierenden Zellen bzw. auf aktivierten T-Zellen in der Lage ist, kostimulatorische Signale auszusenden, die zur Verstärkung der Zellproliferation führen (Liu et al, 1992; Hubbe und Altevogt, 1994). In der T-Zell-Differenzierung führt die Ko-Stimulation von CD24 zur Bildung von Memory-Zellen (Liu et al, 1997). Eine Kooperation von CD24 mit dem β_2 -Integrin LFA-1, die in einer gegenseitigen Beeinflußung intrazellulärer Signale besteht, wurde in aktivierten B-Zellen nachgewiesen (Kadmon et al, 1994). Ruppert et al zeigten 1995, daß die Inkubation mit Antikörper gegen CD24 zur homotypischen Aggregation von monozytären ESb-MP-Zellen führt. Diese Aggregation wird vermittelt durch das Integrin VLA-5 und das zur Immunglobulin-Familie gehörende Zelladhäsionsmolekül L1. Ausgelöst wird die Aggregation durch einen Tyrosinkinase-abhängigen Signalweg, der zur Aktivierung des Integrins führt (Sammar et al, 1997). Dabei kommt es zur Tyrosin-Phosphorylierung der *src*-Kinasen *lck* und *fyn* und zur Phosphorylierung eines kleinen Proteins mit einer Größe von 16-18 kD (Sammar et al, 1997). Die Identität des Proteins konnte leider bisher noch nicht aufgeklärt werden, es ist nur bekannt, daß es in verschiedenen hämatopoetischen Zellen spezifisch mit CD24 in einem Detergens-unlöslichen Komplex assoziiert (Krauss et al, unveröffentlichte Daten). Es läßt sich konstatieren, daß die signaltransduzierenden Funktionen von CD24 mit den Funktionen der Rafts zum Teil stark korrelieren. Hierbei sind besonders die Funktionen in der T-Zell-Aktivierung zu nennen und die Induktion von Tyrosin-Phosphorylierung in der Zelle (s. o.). Aufgrund seiner Struktur ist CD24 ein typisches Raft-Protein. Antikörper gegen CD24 können eine Aktivierung von Integrinen auslösen (Ruppert et al, 1995). In einem präB-Zell-System konnten Hahne et al (1994) und Kilger et al (1995) zeigen, daß die bloße Anwesenheit von CD24 auf der Zelloberfläche ausreichte, um die Aktivität des Integrins VLA-4 zu verändern. Mit Hilfe von CD24 kann möglicherweise der Einfluß der Rafts auf die Zelladhäsion näher untersucht werden.

3. Die Integrin-Familie der Zelladhäsionsmoleküle

Die Integrine sind eine wichtige Familie der Zelladhäsionsmoleküle, die an einer Vielzahl von Zellbindungsprozessen beteiligt ist. Die Integrine agieren als Rezeptoren der extrazellulären

Matrix und als Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle. Die Prozesse der Zelladhäsion, bei denen Integrine involviert sind, sind sehr vielfältig. Sie schließen die Neuro- und Angiogenese (Yip et al, 1998; Friedlander et al, 1995), das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung (Salomon et al, 1997), die Gewebemigration während der Embryonalentwicklung, die Apoptose (Wary et al, 1996), das Homing von Immunzellen (Ruiz et al, 1995), die Rekrutierung von Immunzellen an den Ort der Entzündung (Johnston et al, 1996) und die Tumormetastasierung ein (Gehlsen et al, 1992).

Integrine sind heterodimere, transmembrane Glykoproteine, die aus zwei nicht-kovalent verknüpften Untereinheiten, der α - und der β -Kette, zusammengesetzt sind. Derzeit sind 16 verschiedene α -Ketten und acht verschiedene β -Ketten bekannt. Die Größen der Ketten variieren für die α -Kette zwischen 120 und 180 kD und für die β -Kette zwischen 90 und 110 kD. Bis heute sind 22 verschiedene Integrin-Heterodimere beschrieben (Humphries und Newham, 1998; Bazzoni und Hemler, 1998). Anhand der β -Ketten lassen sich drei Unterfamilien der Integrine differenzieren: die β_1 -Integrine, dazu gehören die Very late activation-Antigene (VLA 1-7), die β_2 -Integrine, welche die Leukozyten-Integrine darstellen und die die β_3 -Integrine, hier ist z. B. der Vitronektin-Rezeptor zu nennen. Die β_1 -Gruppe und die β_3 -Gruppe der Integrine vermitteln vorwiegend die Bindung von Zellen an die extrazelluläre Matrix (Hynes 1987; Hemler 1988), wohingegen die β_2 -Integrine die Zell-Zell-Interaktion von Blutzellen vermitteln (Kishimoto et al, 1990; Springer 1990).

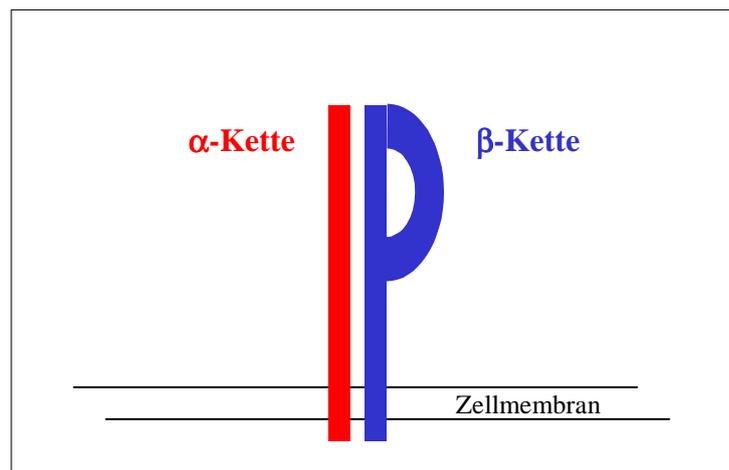


Abb. 4 Schematische Darstellung eines Integrins. Die α - und die β -Kette sind nicht kovalent miteinander verbunden. Die Integrine weisen sowohl einen transmembranen als auch einen zyttoplasmatischen Teil auf.

Die Integrine werden auf vielen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert. Sie sind auf Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, epithelialen Zellen, neuronalen Zellen, Melanomzellen und Hepatozyten zu finden. Wie oben erwähnt vermitteln die Integrine die Bindung zwischen Zellen bzw. zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix. Bei der Zell-Zell-Bindung dienen zelluläre Oberflächenmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie als Bindungspartner. Zu den prominentesten Bindungspartnern gehören ICAM-1, -2 und -3 für die β_2 -Integrine und VCAM-1 und Fibronectin (FN) für die α_4 -Integrine.

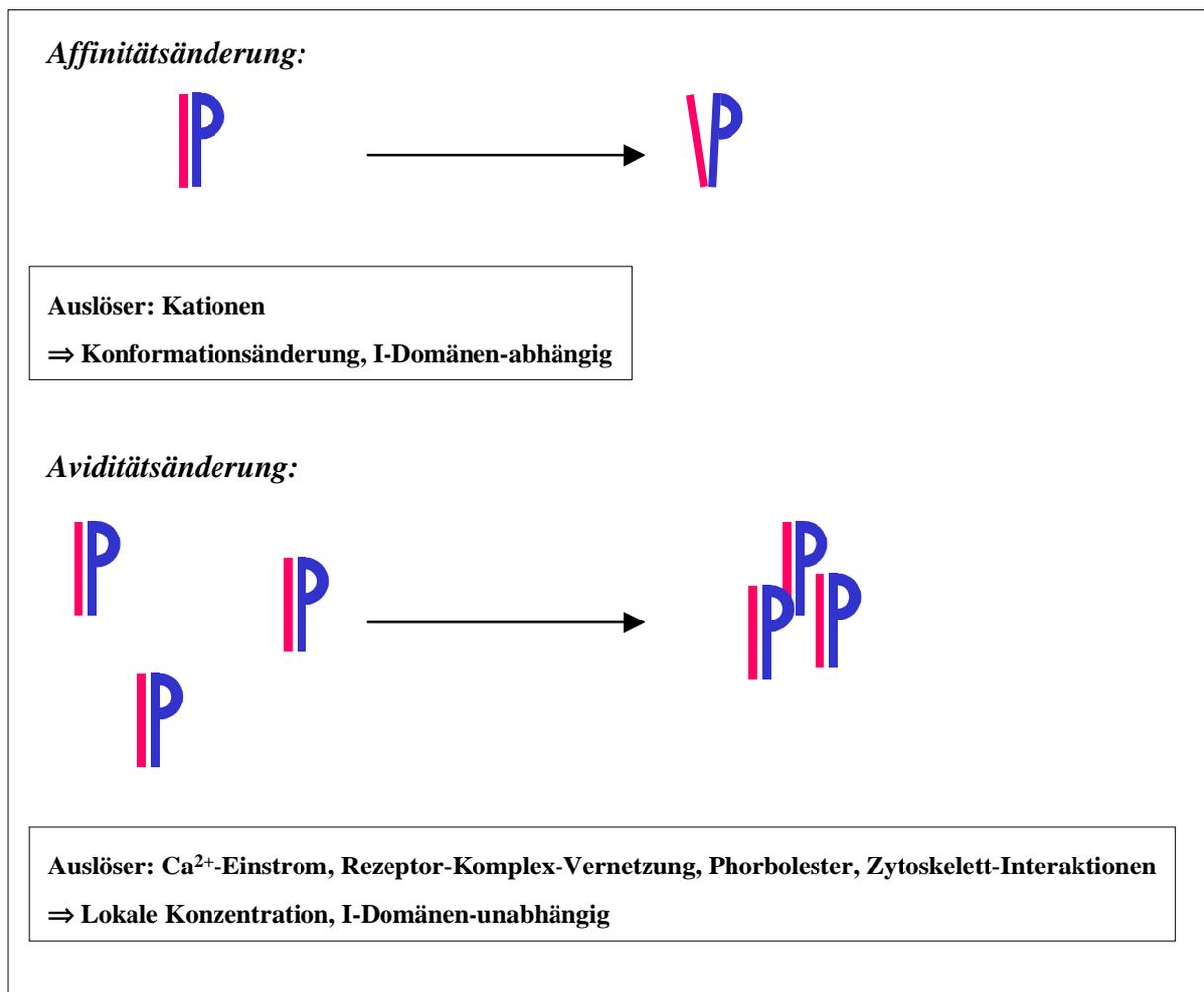


Abb. 5 Überblick über die verschiedenen Wege der Regulation der Integrinaktivität und ihre Auslöser.

Aufgrund der Komplexität und Mannigfaltigkeit der physiologischen Prozesse, bei denen Integrine involviert sind, wird die Aktivität der Integrine streng reguliert. Prinzipiell unterscheidet man zwei grundlegende Mechanismen, die die Aktivität der Integrine und somit die Bindungsstärke regulieren: die Affinitätsregulation und die Aviditätsregulation.

Die Affinität eines Integrins zu seinem Liganden wird durch die Rezeptorkonformation bestimmt. Einen starken Einfluß auf die Konformation und damit die Integrinaffinität nehmen zweiwertige Kationen wie Mg^{2+} und Mn^{2+} . Diese Ionen werden eingesetzt, um experimentell die Affinität von Integrinen zu beeinflussen (Stewart et al, 1998). Potentielle Kationenbindungsstellen wurden sowohl in der α - als auch der β -Kette nachgewiesen, so daß die Konformationsänderung des Integrinheterodimers durch direkte Bindung von Kationen induziert werden kann. In einigen α -Ketten (darunter α_1 , α_2 , α_L und α_M , nicht aber α_4 ; Humphries, 1990) ist am aminoterminalen Ende eine 200 Aminosäuren umfassende Region inseriert, die sog. I-Domäne. Die I-Domäne enthält eine Metallionen-abhängige Bindungsstelle, kurz MIDAS (metal ion-dependent adhesion site) genannt, die in der Lage ist, zweiwertige Kationen zu binden. Die I-Domäne wurde bezüglich der Regulation der Integrin-Affinität intensiv untersucht (Knorr und Dustin, 1997; Leitinger und Hogg, 1999; Leitinger und Hogg, 2000; Huang et al, 2000) und die Struktur bis ins Detail aufgeklärt (Zang et al, 2000; Huth et al, 2000; Huang et al, 2000). In der α_4 -Kette werden bestimmte Aminosäuresequenzen als Bindungsstellen für Kationen diskutiert (Bergelson und Hemler, 1995); MIDAS-Regionen finden sich auch in allen β -Ketten.

Die Wege der Aviditätsregulation von Integrinen wurden erst in den letzten Jahren ausführlicher diskutiert (Stewart et al, 1998; Bazzoni und Hemler, 1998; Yauch et al, 1997; Van Kooyk et al, 1999; Neeson et al, 2000). Hierbei bleibt die Konformation des Integrins unberührt, die Lokalisation ändert sich. Die Integrine werden an einem Punkt, dem sog. „Focal Adhesion“, konzentriert, die lokale Konzentration führt zu einer erhöhten Bindungsaktivität. Die Avidität von Integrinen kann beeinflusst werden durch die Stimulation der Proteinkinase C (Rothlein und Springer, 1986; Stewart et al, 1996; Kolanus und Seed, 1997). Experimentell kann dieser Weg durch die externe Gabe von Phorbolestern simuliert werden. Auch alle Substanzen, die einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle verursachen, führen unter Einbeziehung von Enzymen wie der Protease Calpain und des Zytoskeletts zu einer erhöhten Integrinavidität (Stewart et al, 1998). Die Avidität von Integrinen kann auch durch die direkte Interaktion mit Zytoskelett-Komponenten verändert werden (Liu et al, 1999; Liu und Ginsberg, 2000). Auch das Vernetzen von Rezeptor-Komplexen, z. B. des T-Zell-Rezeptor-Komplexes, kann zu einer erhöhten Avidität führen (Pardi et al, 1992; Stewart et al, 1998).

4. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Mikrodomänen in der Zellmembran haben vielfältige Funktionen. Sie sind nicht nur in verschiedene Transportsystem in der Zelle involviert, sie spielen auch eine essentielle Rolle bei der Regulation der Signaltransduktion in Lymphozyten. Eine Beteiligung an Prozessen der Zelladhäsion konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden.

CD24 ist aufgrund seiner Struktur als GPI-geankertes Molekül ein typisches Raft-Molekül und ist in verschiedenen Zellen in Prozesse der Signaltransduktion involviert. Viele dieser Prozesse ähneln solchen, bei denen Rafts funktionell relevant sind.

In der vorliegenden Arbeit sollte die mögliche Rolle von Rafts bei der Regulation der Zelladhäsion untersucht werden. Hierbei wurde die Hypothese aufgestellt, daß das Clustern von Rafts an der Zelloberfläche evtl. eine ideale Plattform für die schnelle Regulation der Zelladhäsion darstellt.

Ausgehend von der Beobachtung, daß CD24 auch die Aktivität von VLA-5 in monozytären ESb-MP Zellen beeinflussen kann, sollte versucht werden, eine ähnliche Regulation an CD24-positiven Thymozyten zu untersuchen. Ein Hauptintegrin auf diesen Zellen stellt das LFA-1 dar. Die Bindung des Integrins LFA-1 an seinen Bindungspartner ICAM-1 wurde daher zu diesen Untersuchungen als Modell verwendet.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit beschäftigt sich mit der eigentlichen Rolle des CD24 als Raft-assoziiertes Molekül. Auch hierbei wurde die Regulation von Integrinen als Assay-System gewählt. Bei diesen Untersuchungen wurde auf präB-Zellen zurückgegriffen, in denen bekannt ist, daß die alleinige Anwesenheit von CD24 auf der Zelloberfläche die Aktivität des VLA-4-Integrins beeinflusst.

B. Material und Methoden

I. Zellbiologische und tierexperimentelle Methoden

1. Zelllinien

<i>Name</i>	<i>Herkunft/ Zelltyp</i>	<i>Spezifität bei Hybridomen</i>	<i>Referenz</i>
M1.69	Hybridom	Maus CD24	Springer et al 1978
30H12	Hybridom	Maus CD90	Ledbetter et al, 1979
12-15	Hybridom	Maus CD2	Altevogt et al, 1989
500A2	Hybridom	Maus CD3	Havran et al, 1987
79	Hybridom	Maus CD24	Kadmon et al, 1992
30G12	Hybridom	Maus CD45	Ledbetter und Herzenberg, 1979
Tib 218	Hybridom	Maus CD18	Sanchez-Madrid et al, 1983
Tib 213	Hybridom	Maus CD11a	Sanchez-Madrid et al, 1983
FD18.5	Hybridom	Maus CD11a	Sarmiento et al, 1982
YN.1/1.7	Hybridom	Maus CD54	Prieto et al, 1989
5/3	Hybridom	Maus α_4	Altevogt et al, 1995
ESb 289	T-Lymphom		Schirmacher et al, 1979
ESb-MP	Adhärente Variante von ESb 289		Schirmacher et al, 1982
N232.18	PräB-Zellymphom aus CD24 k.o. Mäusen		Hahne et al, 1994
18H18	N232.18 CD24-Transfektante		Hahne et al, 1994
CHO	Ovarialzellen von chinesischen Hamstern		Tobey und Campbell, 1965
Cos-7	Affennierenzelllinie		
CrP 27.4	T-Zell-Hybridom		Klein et al, 1995 + 1998
CrP 56.1	T-Zell-Hybridom		Klein et al, 1995 + 1998

1H3	T-Zell-Hybridom		Dr. Bruno Kyewski, DKFZ
EL-4	T-Zell-Lymphom		Farrar et al, 1980
TK1	T-Zell-Lymphom		Bargatze et al, 1987

2. Zellkulturbedingungen

2.1 Zellkultur

Bei den meisten Zellen handelt es sich um in Suspension wachsende Zelllinien. Sie wurden bei einer Dichte von ca. 1×10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 (Life Technologies), 5 % FCS (Life Technologies, hitzeinaktiviert bei 56°C für 1 h), 10 mM HEPES pH 7,0, 2mM Glutamin und 50 mM 2-ME in Plastikkulturflaschen (Renner, Dannstadt) bei 37°C , 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 kultiviert und alle 2 bis 3 Tage, je nach Dichte, passagiert. Die adhären wachsenden Zellen CHO und Cos-7 wurden in DMEM (Life Technologies), 10 % FCS (Life Technologies, hitzeinaktiviert bei 56°C für 1 h), 10 mM HEPES pH 7,0, 2mM Glutamin und 50 mM 2-ME kultiviert und zur Passage mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst.

2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach Anfärben der toten Zellen mit 0,16 % Trypanblau, 0,9 % NaCl in einer Neubauer Zählkammer.

2.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren wurden jeweils 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen in 900 μl FCS und 100 μl DMSO (Merck, Darmstadt) aufgenommen, zunächst bei -70°C für 24 h gelagert und anschließend zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte zügig bei 37°C . Nach einmaligem Waschen in vorgewärmtem Kulturmedium wurden die Zellen in 10 ml Medium ausgesät.

3. Versuchstiere

Zur Organentnahme wurden 6 bis 8 Wochen alte C57/B16-Mäuse (Charles River) bzw. CD24 k. o.-Mäuse auf C57/B16-Hintergrund (Dr. Peter Nielsen, MPI für Immunbiologie, Freiburg) verwendet.

4. Naive Zellen

4.1 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus Organen

Zur Organentnahme wurden die Mäuse durch CO₂ getötet. Es wurden der Thymus, die Milz und das Knochenmark der Mäuse verwendet. Die Einzelzellsuspensionen aus Thymocyten wurden direkt für Experimente eingesetzt, die Milzzellsuspensionen und die Knochenmarkssuspensionen wurden steril präpariert und in Kultur genommen.

Der Thymus wurden zwischen den matten Enden zweier Objektträger zerrieben und anschließend durch ein Nylonnetz der Maschenweite 30 µM (Eckert, Waldkirch) in ein 50 ml-Röhrchen (Renner, Dannstadt) filtriert, um Einzelzellsuspensionen zu erhalten. Die gesamte Präparation erfolgte in PBS. Nach einmaligem Waschen in PBS wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt, bei der das Zellpellet mit 1 ml Erythrozytenpuffer in Suspension leicht geschüttelt und danach erneut mit PBS gewaschen wurde. Alle Arbeitsgänge mit frischen Zellen wurden auf Eis durchgeführt. Die Sedimentation der Zellen erfolgte jeweils bei 300 x g für 5 Min.

Die Milz wurde mittels zweier gebogener Kanülen in Petrischalen zerrupft und durch wiederholtes Resuspendieren eine Einzelzellsuspension erzeugt. Die Präparation erfolgte in Kulturmedium.

Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden Femur und Tibia der Hinterbeine präpariert und die Knochenenden jeweils mit einem Skalpell abgeschnitten. Das Knochenmark wurde dann mit einer mediumgefüllten Spritze mit dünner Kanüle aus den Knochen gespült.

Lysepuffer für Erythrozyten (Gey´s solution)

155 mM NH₄Cl

10 mM KHCO₃

0,1 mM EDTA

PBS (phosphate buffered saline), pH 7,2

137 mM NaCl

3 mM KCl

8 mM Na₂HPO₄

4.2 Knochenmarkskulturen nach Whitlock-Witte

Die aus dem Knochenmark gewonnenen Einzelzellsuspensionen wurden in einer Konzentration von 5 x 10⁶ Zellen/ml in RPMI 1640 (Life Technologies), 5 % FCS (Life

Technologies, hitzeinaktiviert bei 56 ° C für 1 h), 10 mM HEPES pH 7,0, 2mM Glutamin und 50 mM 2-ME ohne Zusatz von Antibiotika ausgesät und bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert.

4.3 Stimulation von T-Zellen durch ConA (ConA-Blasten)

Concanavalin A wirkt auf T-Zellen mitogen. Mit Hilfe dieser Substanz kann man aus Milzeinzelzellsuspensionen aktivierte T-Zellen, auch genannt T-Zell-Blasten, gewinnen. Dazu wurden die Zellen in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 (Life Technologies), 5 % FCS (Life Technologies, hitzeinaktiviert bei 56 ° C für 1 h), 10 mM HEPES pH 7,0, 2mM Glutamin und 50 mM 2-ME ausgesät und mit 5 µg/ml Concanavalin A (Sigma, Deisenhofen) bei 37 ° C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 48 h waren aktivierte T-Zellen als Zellaggregate sichtbar.

4.4 Stimulation von B-Zellen mit LPS (LPS-Blasten)

LPS wirkt auf B-Zellen mitogen und induziert die Bildung von aktivierten B-Zell-Blasten aus Milzeinzelzellsuspensionen. Die Zellen werden in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 (Life Technologies), 5 % FCS (Life Technologies, hitzeinaktiviert bei 56 ° C für 1 h), 10 mM HEPES pH 7,0, 2mM Glutamin und 50 mM 2-ME ausgesät und mit 1µg/ml LPS (Sigma, Deisenhofen) bei 37 ° C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 48 h waren aktivierte B-Zellen als Zellaggregate sichtbar.

4.5 Ernten von ConA-Blasten bzw. LPS-Blasten

Das Ernten der aktivierten T-Zellen bzw. B-Zellen erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation (Kurnick et al, 1980). Die Zellen wurden bei 300 x g sedimentiert und in 1 ml PBS aufgenommen. Ein 15 ml-Plastikröhrchen (Renner, Dannstadt) wurde mit FCS benetzt und darin ein Gradient aufgebaut. Auf den Boden des Röhrches wurden 3 ml einer 70 %igen Lösung von Percoll (Amersham-Pharmacia, Freiburg) in PBS pipettiert, die mit 3 ml einer 50 %igen Percoll-Lösung in PBS und 3 ml einer 30 %igen Percolllösung in PBS überschichtet wurde. Die Zellsuspension wurde auf den Gradienten gegeben und für 20 Min bei 500 x g ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation ergab sich schematisch folgendes Bild (Abb. 6):

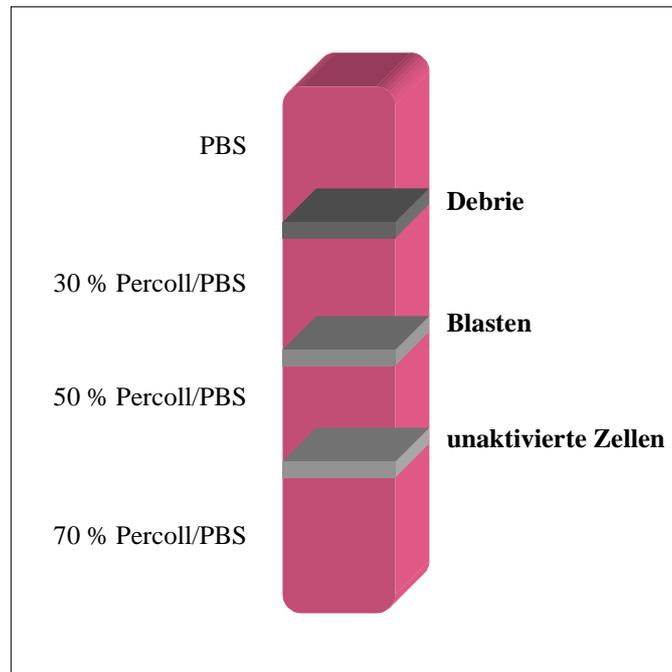


Abb. 6 zeigt schematisch den Gradienten zum Aufreinigen von Blasten nach der Zentrifugation. Die Blasten befinden sich im mittleren der drei Ringe.

Im oberen Ring sammelten sich die toten Zellen an, im unteren Ring fanden sich die Einzelzellen wieder. Die aktivierten T-Zellen, die dicke Zellaggregate bildeten, waren im mittleren der drei deutlich sichtbaren „Zellringe“ zu finden. Mit Hilfe einer langen Pasteurpipette wurde der interessante Ringe vorsichtig abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um sie vom Percoll zu befreien. Die Reinheit der Zellen wurde mittels FACS-Analyse (s. u.) mit anti-CD3 Antikörper überprüft und lag jeweils etwa bei 95 %.

5. Infektion von Zellen mit Adenoviren

Die verwendeten CD24^{-/-} präB-Zellen wurden für bestimmte Experimente mit Adenoviren infiziert, die im Erbgut ein gelbfluoreszierendes Protein codierten, welches GPI-geankert war (YFP-GPI). Die Adenoviren wurden von Dr. Patrick Keller vom EMBL her- und zur Verfügung gestellt. Der Virusstock wurde bei -20°C gelagert und zur Infektion in 2 ml RPMI verdünnt. Die Menge des eingesetzten Virusstocks hing von der Zahl der Zellen ab und lag zwischen 2 und 5 μl . Die Zellen wurden pelletiert und in der Virusverdünnung aufgenommen. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C . Danach wurden die Zellen pelletiert, in frischem

Medium aufgenommen und bei 37 ° C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Die Expression des YFP-GPI wurde nach 24 h im Facs analysiert.

6. Transfektion von Zellen

Zur Transfektion wurden verschiedene Methoden eingesetzt. Die Transfektion mit dem Superfect-Kit von Qiagen und die Transfektion mit dem FuGene-Kit von Boehringer beruhen auf der Lipofectamin-Methode. Hierbei wird ein lipophiler Komplex aus Reaktionsagens und DNA gebildet, der sich an die Zelle anheftet und ein einschleusen der DNA ermöglicht. Bei der Transfektion mittels Elektroporation wird die Zellmembran durch Stromstöße löchrig gemacht, um so ein Eindringen der Fremd-DNA zu ermöglichen.

6.1 Transfektion mit FuGene

Die Transfektion wurde genau nach Herstellerangaben durchgeführt. 12 µl des FuGene Agenes wurden mit 100 µl serumfreien Medium vermischt und 4 µg DNA zugegeben. Die Komplexbildung erfolgte für 15 Min bei RT. 1×10^6 Zellen wurden in 8 ml Medium aufgenommen und in eine kleine Zellkulturflasche gegeben. Hierzu wurde der DNA-FuGene-Komplex gegeben und die Zellen bei 37 ° C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert.

6.2 Transfektion mit Superfect

Hierbei wurden 5 µg DNA in 100 µl RPMI bzw. DMEM aufgenommen und mit 8 µl Superfect Reagenz vermischt. Die Komplexbildung erfolgte für 10 Min bei RT. Danach wurden 400 µl Medium zugegeben. Ca. 1×10^6 Zellen wurden in 1,6 ml Medium in einer 6-Loch-Platte ausgesät und der DNA-Komplex tropfenweise zugegeben. Adhärent wachsende Zellen wurden genauso transfiziert wie Suspensionszellen, allerdings wurde hier der DNA-Komplex nur für 2 – 3 h auf den Zellen belassen. Die Monolayer wurden dann gewaschen und die Zellen weiter kultiviert.

6.3 Transfektion durch Elektroporation

Für die Elektroporation wurden 5×10^6 Zellen pro Ansatz in 180 µl PBS aufgenommen und in eine Elektroporationsküvette (Biorad) gegeben. 20 µg DNA wurden in 20 µl PBS gelöst und zu den Zellen pipettiert. Das Gemisch wurde zunächst für 10 Min auf Eis inkubiert und dann die Elektroporation durchgeführt. Der Stromstoß erfolgte bei 960 µF und 270 V für 50 – 60 ms in einem Elektroporationsgerät der Firma Biorad. Anschließend wurden die Zellen

nochmals für 10 Min auf Eis inkubiert, bevor sie in konditioniertem Medium aufgenommen und bei 37 ° C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert wurden.

Die Analyse aller transfizierten Zellen erfolgte nach 48 h im FACS-Gerät.

7. Zellbindungsversuche

Zur Untersuchung von Integrin-Substrat-Bindungen wurden Zellbindungsversuche durchgeführt. Murines ICAM-1 wurde affinitätschromatographisch aus ESb-MP oder ESb 289 Zellen aufgereinigt. ICAM-1 in β -Octyl-Glucopyranoside (ca. 150 μ g/ml) wurde 1 : 10 in TBS verdünnt und 8-Kammer-Objektträger (Nunc, Wiesbaden) über Nacht bei 4 °C damit beschichtet. Alternativ wurde FN40 (Gibco) in einer Konzentration von 10 μ g/ml in TBS verwendet. Der Objektträger wurde dann für 30 Min mit 1 % Ovalbumin oder 3% BSA in TBS bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken. Für den Bindungsversuch wurden die Zellen in einer Konzentration von 5×10^6 /ml für aktivierte T-Zellen und präB-Zelllinien, bzw. 1×10^7 /ml für Thymozyten, in Bindungspuffer (HBSS) aufgenommen, 200 μ l-Aliquots in die Kammern gegeben und für 30 Min bei RT binden lassen. Anschließend wurden die Kammern vorsichtig vom Objektträger gelöst, die ungebundenen Zellen in PBS abgepült und die gebundenen Zellen mit 2 % Glutaraldehyd in PBS auf Eis für 30 Min fixiert. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen von 6 unabhängigen Feldern der gebundenen Zellen mit Hilfe des IMAGE 1.47-Programmes.

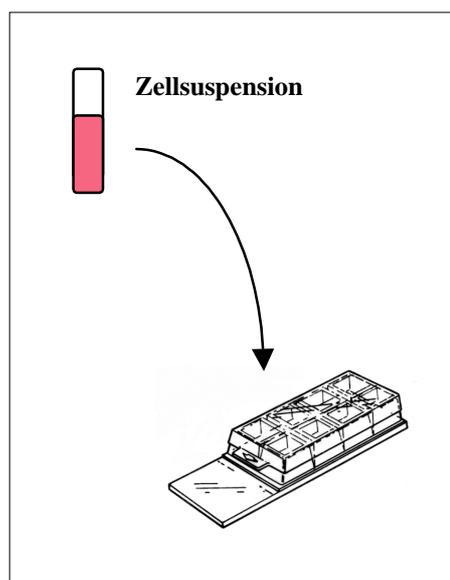


Abb. 7 zeigt eine 8-Loch-Kammer, die für Bindungsversuche verwendet wurde

Zur Aktivierung durch Kationen wurden die Ionen im Bindungspuffer durch 5 mM MgCl₂ und 1mM EGTA ersetzt. PMA-Behandlung der Zellen wurde ebenfalls in Bindungspuffer durchgeführt. Dazu wurde etwa 5 Min vor dem Bindungsversuch PMA in einer Konzentration von 50 ng/ml zum Bindungspuffer gegeben und während der Dauer des Versuchs darin belassen. Die Aktivierung durch Antikörper oder CTx bzw. CTx-B (Sigma, Deisenhofen) erfolgte auf die gleiche Art und Weise, die Konzentrationen lagen hier bei 15 µg/ml bzw. wurden titriert.

Sollte die Bindung blockiert werden, wurden die Zellen etwa 5 Min mit blockierendem Antikörper in Bindungspuffer vorinkubiert. Auch der blockierende Antikörper wurde während des gesamten Versuchs auf den Zellen belassen.

Um involvierte Signalwege zu untersuchen, wurden die Zellen mit verschiedenen kinasespezifischen Inhibitoren vorbehandelt. Die Behandlung wurde wie folgt durchgeführt: Die Zellen wurden jeweils für 15 Min bei RT vorbehandelt und die Inhibitoren während des Versuchs auf den Zellen belassen. Die eingesetzten Konzentrationen waren:

<i>Inhibitor</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Konzentration</i>
Genistein	Tyrosin-Kinasen	20 µM
Wortmannin	PI3-Kinase	20 nM
Bisindolylmaleimide I	PKC	10 nM

Die Inhibitoren wurden von der Firma Calbiochem in Bad Soden bezogen.

Um den Einfluß von Zytoskelett-Veränderungen auszutesten wurden die Zellen auf die oben beschriebene Weise mit 1 µM Jasplakinolide (Molecular Probes, Leiden, NL) bei 37 ° C für 30 Min vorinkubiert.

TBS

10 mM Tris/HCl pH 8,0

150 mM NaCl

HBSS (Hank's buffered saline)

5 mM KCl

0,5 mM KH₂PO₄

137 mM NaCl

4 mM NaHCO₃
0,3 mM Na₂HPO₄·7H₂O
6 mM Glucose
26,5 µM Phenolrot
2 mM MgCl₂
2 mM CaCl₂
10 mM HEPES

8. Transmigrationsversuche

Untersuchungen zur Integrin-vermittelten Migration wurden mit Hilfe von Transwell-Membran-Kammern der Firma Costar durchgeführt. Diese Kammern bestehen aus einem Kunststoffgehäuse, in dem sich ein herausnehmbarer Einsatz mit einer Polyester-Membran definierter Porengröße befindet. Dieser Membraneinsatz trennt die Kammer in zwei Kompartimente, zwischen denen ein Medien- und Zellaustausch nur durch die Membran erfolgen kann. Verschlossen wurde die Kammer mit einem Kunststoffdeckel. Die Experimente wurden wie folgt durchgeführt:

Die Membran wurde auf der Unterseite mit der Substrat-Lösung FN40 in einer Konzentration von 10 µg/ml beschichtet und für 90 Min bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Anschließend wurden in das untere Kompartiment der Kammer 500 µl RPMI/0,5 % BSA gefüllt und in das obere Kompartiment 100 µl der Zellsuspension gegeben. Die Zellen lagen in einer Konzentration von 5×10^6 /ml in RPMI/0,5 % BSA vor, so daß ein Äquivalent von 100 µl einer eingesetzten Zellzahl von 5×10^6 entsprach. Aktivierende Agenzien wurden direkt der Zellsuspension zugesetzt und während des gesamten Experimentes darin belassen. Die Transmigration wurde für 16 h bei 37 °C erlaubt. Anschließend wurde die Lösung aus dem unteren Kompartiment samt der transmigrierten Zellen abgesaugt, bei 300 x g abzentrifugiert und das Zellpellet in 10 µl PBS aufgenommen. Das Zählen der transmigrierten Zellen erfolgte in einer Neubauer Zählkammer.

9. Cholesterin-Depletion

Zur Cholesterin-Depletion wurden zwei verschiedene Verfahren verwendet: erstens die Behandlung der Zellen mit Methyl-β-Cyclodextrin (MCD) und zweitens die Inkubation der Zellen mit den HMG-Co-A-Reduktase-Inhibitoren Lovastatin oder Pravastatin.

MCD (Sigma, Deisenhofen) extrahiert das Cholesterin der Zelle aus der Zellmembran. Die Zellen wurden für 15 Min mit verschiedenen Konzentrationen MCD bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend direkt für Bindungsversuche verwendet. Die Vitalität der Zellen wurde nach Behandlung durch Anfärben mit 0,16 % Trypanblau, 0,9 % NaCl überprüft.

Lovastatin und Pravastatin (Dr. Jörg Kreuzer, Universität Heidelberg) sind Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase, die mit der Cholesterin-Synthese interferieren. Die Zellen wurden für 20 h mit 1 μ M Lovastatin oder Pravastatin kultiviert und dann direkt für Bindungsversuche verwendet.

10. PI-PLC-Behandlung von Zellen

Die Phosphoinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) spaltet Moleküle auf der Zelloberfläche spezifisch am GPI-Anker ab. Die Behandlung der Zellen wurde verwendet, um CD24 von der Zelloberfläche zu entfernen. Dazu wurden 2×10^7 Zellen zweimal in serumfreiem Medium gewaschen, in 2 ml serumfreiem Medium aufgenommen und für 2 h mit 2 U PI-PLC versetzt bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit serumfreiem Medium gewaschen und für Bindungsversuche eingesetzt.

11. Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie (Praks und Herzenberg, 1984) ist ein Verfahren zur Zählung und Charakterisierung von Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. Grundsätzlich können alle Merkmale eines Partikels, die sich über Lichtbeugung, -streuung oder Fluoreszenz charakterisieren lassen, zur durchflußzytometrischen Analyse herangezogen werden. Lichtbeugung und -streuung erlauben eine Charakterisierung der Größe sowie der Binnenstruktur eines Partikels, z. B. von Zellen, Zellorganellen oder Kunststoffpartikeln, während durch Anfärbung definierter Zelloberflächenstrukturen mit speziellen Farbstoffen, gegebenenfalls unter Zuhilfenahme farbstoffmarkierter, monoklonaler Antikörper, eine weitere Differenzierung möglich ist. Die Analyse solcher Merkmale wurde im sog. FACScan-Gerät der Firma Beckten Dickinson, Heidelberg durchgeführt. Mit Hilfe eines ähnlichen Gerätes, dem FACSvantage, konnten die Zellen anhand bestimmter angefärbter Oberflächenantigene sortiert werden. Bei diesem Verfahren wird die Zellsuspension zwischen zwei Elektroden durchgeleitet und im Falle eines positiven Signals, d. h. eines angefärbten Antigens, durch einen elektronischen Impuls abgelenkt und in einer 6-Loch-Platte gesammelt.

11.1 Immunfluoreszenzfärbung für die FACS-Analyse

11.1.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Für die Analyse wurden je Färbung 1×10^6 der zu untersuchenden Zellen in Plastikröhrchen (PS-Röhrchen, 7x50 mm, Greiner, Nürtingen) überführt und bei 300 x g sedimentiert. Das Pellet wurde dann für 30 Min mit 1 μ g Antikörper in 50 μ l FACS-Puffer bzw. mit 50 μ l Hybridomüberstand auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nun folgte die Detektion des Erstantikörpers mittels Fluoreszenzfarbstoffgekoppeltem Zweitantikörper. Alle folgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Die Zellen wurden mit einer optimalen Konzentration an Zweitantikörper, verdünnt in FACS-Puffer, wiederum für 30 Min auf Eis inkubiert und anschließend zweimal in PBS gewaschen. Optimale Verdünnungen der Zweitantikörper wurden in Vorexperimenten ermittelt. Nur mit Zweitantikörper inkubierte Zellen dienten als Hintergrundkontrolle, um die unspezifische Bindung des Zweitantikörpers quantifizieren zu können. Zur Analyse wurden die gefärbten Zellen mit 500 μ l FACS-Puffer verdünnt. Es wurden jeweils 10 000 Ereignisse (lebende Zellen) je Probe aufgenommen. Tote und nicht gewünschte Zellen konnten bei der Aufnahme durch ihre unterschiedliche Größe und Granularität und durch ihre Anfärbbarkeit mit Propidium-Jodid ausgegrenzt werden. Propidium-Jodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der durch die permeable Zellwand toter Zellen diffundieren kann und die Zell-DNA anfärbt. Zur Färbung wurden die Zellen direkt vor der Analyse, nach dem Aufnehmen in 500 μ l FACS-Puffer, mit 1 μ g/ml Propidium-Jodid versetzt. Die Fluoreszenzemission wurde mit einem Argonlaser bei 480 nm angeregt und die relative Rotfluoreszenz (bei PE-gekoppelten Antikörpern) und Propidium-Jodid-Färbung bzw. Grünfluoreszenz. bei FITC-konjugierten Zweitantikörpern) bestimmt. Je nach Zelltyp wurden Analysefenster entsprechend der Zellgröße (FSC = forward scatter) und der Zellgranularität (SSC = side scatter) gewählt.

11.1.2 Direkte Immunfluoreszenzfärbung

Bei der direkten Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern inkubiert, die direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert waren. Auch hierbei wurden als Farbstoffe PE und FITC, aber auch FLUOS verwendet. FLUOS ist wie FITC ein grünfluoreszierender Farbstoff. Die Färbung erfolgte genau wie in 11.1.1. für die indirekte Färbung beschrieben, allerdings entfiel hier die Inkubation mit einem Zweitantikörper. Alle Färbeschritte wurden von Beginn an im Dunkeln durchgeführt.

FACS-Puffer

PBS

5 % FCS

0,1 % NaN₃**11.2 Fixation von Zellen nach der Immunfloreszenzfärbung**

Konnten die Zellen nicht sofort analysiert werden, so wurden sie nach der Inkubation mit Zweitantikörper bzw. direkt konjugierten monoklonalen Antikörper gewaschen, sedimentiert und mit 50 µl einer 1 %igen Paraformaldehyd-Lsg. in PBS für 10 Min auf Eis fixiert. Nach der Zugabe von 500 µl PBS konnten die Zellen dann bis zu zwei Tage im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt werden.

11.3 Immunfluoreszenzfärbung zum Zellsort

Die Färbung der Zellen für den Zellsort im FACSVantage erfolgte prinzipiell genauso wie unter 11.1 und 11.2 für die FACS-Analyse. Da die Zellen anschließend jedoch in Kultur gehalten werden sollten, wurden alle Schritte steril durchgeführt. Außerdem wurden pro Zellsort etwa 1×10^7 Zellen eingesetzt und in entsprechend größeren Volumina gefärbt. Die gewünschten Zellen wurden in eine 6-Loch-Platte sortiert und anschließend in konditioniertem Medium aufgenommen.

12. Laser-Scanning-Mikroskopie

Analysen zur Verteilung von Oberflächenantigenen wurden mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Herbert Spring von der Abteilung für Biomedizinische Strukturforschung am DKFZ durchgeführt.

Hierzu wurden die Thymozyten in einer Dichte von 1×10^7 /ml und präB-Zellen in einer Dichte von 5×10^6 /ml in PBS aufgenommen und für 20 Min bei RT auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträger immobilisiert. Objektträger und Deckgläschen wurden vor dem Experiment in einem äquimolaren Gemisch aus Aceton und Methanol für 30 Min im Ultraschallbad gründlich gereinigt und an der Luft trocknen lassen. Zur Beschichtung der Objektträger wurden diese in 0.01 % Poly-L-Lysin in RPMI in einer Glasküvette über Nacht bei 4 °C inkubiert und dann direkt verwendet. Nach der Immobilisierung der Zellen wurden sie in 1% frisch präpariertem Formaldehyd in PBS für 10 Min auf Eis fixiert. Anschließend folgte die Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen interessante Antigene, indem die Zellen mit einem

entsprechendem Hybridomüberstand für 30 Min bei RT inkubiert wurden. Der Erstantikörper wurde mittels FITC-konjugiertem Anti-Ratte-Antikörper detektiert. Hierzu wurden die Zellen mit einer optimalen Verdünnung des Zweitantikörpers in FACS-Puffer (s. o.) für 30 Min bei RT im Dunkeln inkubiert. Alternativ wurde die Färbung mit einem FITC-, PE oder Cy3-konjugierten, monoklonalen Antikörper oder mit FITC-konjugiertem CTx-B durchgeführt, hierbei entfiel die Inkubation mit Zweitantikörper. Alle Färbeschritte ab Inkubation der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff wurden im Dunkeln durchgeführt.

Zur CTx-induziertem Vernetzung wurden die Zellen vor der Immobilisierung mit CTx (15µg/ml) in PBS inkubiert.

Nach der Färbung wurden die Zellen in Elvanol eingebettet und mit Deckgläschen versehen. Bis zur Analyse wurden die Objektträger bei 4 ° C im Dunkeln aufbewahrt.

II. Biochemische Methoden

1. Antikörper

Die verwendeten monoklonalen Antikörper wurden entweder aus Zellüberständen gewonnen und über eine Anti-Ratte-IgG-Säule affinitätschromatographisch aufgereinigt, oder waren kommerziell erhältlich. Zur Immunfluoreszenz wurden Hybridomüberstände bzw. gereinigte Antikörper mit entsprechenden Zweitantikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoff konjugiert waren, verwendet, oder monoklonale Antikörper wurden direkt mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt.

1.1 Monoklonale Antikörper

<i>Name</i>	<i>Antigen</i>	<i>Spezies</i>	<i>Herkunft</i>
4G10	Phospho-Tyrosin	Maus	Upstate Biotechnologies
G7	Maus CD90	Ratte	Pharmingen

1.2 Polyklonale Antikörper

<i>Name</i>	<i>Antigen</i>	<i>Spezies</i>	<i>Herkunft</i>
Anti-lck	lck-Kinase	Ziege	Santa Cruz
Anti-hck	hck-Kinase	Kaninchen	Santa Cruz
Anti-PI3-Kinase	P85-Untereinheit der PI3-Kinase	Kaninchen	Upstate Biotechnologies
Anti- α_4 -Serum	Zytoplasmatischer Teil von α_4	Kaninchen	Prof. Dr. B. Holzmann, München
Anti-CTx	CTx-B-Untereinheit	Kaninchen	Sigma

1.3 Sekundärantikörper

Ziege-Anti-Ratte HRP

Ziege-Anti-Kaninchen-HRP

Ziege-Anti-Maus-HRP

Donkey-Anti-Ziege-HRP

Ziege-Anti-Ratte-PE

Die Peroxidase (HRP-) gekoppelten Antikörper wurden von Dianova, Hamburg und die Phycoerythrin (PE-) gekoppelten Antikörper von Biosource bezogen.

2. Reinigung von Antikörpern

Die affinitätschromatographische Aufreinigung von Antikörpern aus Hybridomüberstand erfolgte über eine Anti-Ratte-IgG-Säule. Hierbei handelt es sich um aus Kaninchen gewonnene Antikörper gegen Ratten IgG, welche an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt sind.

Die Hybridomzellen wurden in RPMI-Komplettmedium in Rollerflaschen (Corning) kultiviert und expandiert. Die dicht gewachsenen Kulturen wurden bei 300 x g abzentrifugiert, die Überstände mit 0,1 % NaN₃ versetzt und bis zur Aufreinigung gesammelt.

Der gesammelte Hybridom-Überstand wurde zunächst zum Vorreinigen über eine Sepharose 4MB-Säule (Amersham-Pharmacia, Freiburg) passagiert, um ihn von Zelldebris zu befreien.

Die Anti-Ratte-IgG-Säule wurde vor dem Gebrauch mit dem 10fachen Säulenvolumen an

PBS gewaschen. Nun wurde der vorgereinigte Hybridomüberstand aufgetragen und über die Säule passagiert. Nach dem Waschen der Säule folgte das Eluieren mit Glycin/HCl pH 2,7 in 8 ml-Fractionen, die sofort mit 500 µl Tris/HCl pH 8,0 neutralisiert wurden. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte im Photometer, bei 280 nm gegen PBS. Eine o. D.-Einheit von 1,5 entspricht einer Antikörperkonzentration von etwa 1 mg/ml. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden gesammelt und zur Reduktion der Salzkonzentration über Nacht gegen 5 l PBS dialysiert. Die Konzentrierung der Antikörper-Lösung auf 1 mg/ml erfolgte mittels eines AMICON-Filters mit einem Cut-off von 30 kD.

3. Kopplung von Antikörpern an Fluoreszenz-Farbstoffe

Für bestimmte Anwendungen war es notwendig, monoklonale Antikörper direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen zu konjugieren.

3.1 Kopplung von Antikörpern an FITC

Zur Kopplung der Antikörper an FITC wurde der FLUOS-Kopplungs-Kit der Firma Roche verwendet. Dazu wurde das gewünschte Aliquot des gereinigten, monoklonalen Antikörpers zunächst gegen den Kopplungspuffer dialysiert und anschließend für 1 h bei RT mit dem Fluoreszenzfarbstoff inkubiert. Das Konjugat wurde über eine Sephadex G50-Säule vom freien Farbstoff abgetrennt.

Kopplungspuffer

100 mM NaHCO₃

3.2 Kopplung von Antikörpern an Cy3

Hierzu wurde der Cy3-Labeling-Kit der Firma Amersham verwendet. 100 µg der Antikörperlösung in PBS wurden mit 5 µl des Kopplungspuffers und einer Ampulle des Fluoreszenzfarbstoffes für 30 Min bei RT inkubiert. Über eine Gelfiltrations-Säule wurden dann freier und Antikörper-gebundener Farbstoff voneinander getrennt.

4. Aufreinigung von Antigen mittels Affinitätschromatographie

4.1 Herstellung einer Affinitätssäule

Für 10 ml Säulenvolumen wurden 2 g gefriergetrocknete CNBr-aktivierte Sepharose (Amersham-Pharmacia) zuerst mit 500 ml 0,1 M HCl und anschließend mit 100 ml Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) in einer Filternutsche gewaschen. Der über die Anti-Ratte-IgG-Säule (siehe oben) gereinigte Antikörper wurde für 2 h gegen Kopplungspuffer dialysiert und dann zu der gequollenen Sepharose gegeben. Die Mischung wurde zur Kopplung über Nacht bei 4 ° C über Kopf rotiert und anschließend die Sepharose abzentrifugiert. Zur Entfernung lose gebundenen Antikörpers wurde die Sepharose mit Glycin/HCl pH2,7 gewaschen. Um die noch verbleibenden unspezifischen, aktiven Gruppen der Sepharose abzusättigen, wurde die Sepharose dann für 1 h mit 1 M Tris/HCl pH 8,0 inkubiert. Die Antikörper-gebundene Sepharose wurde danach zweimal mit PBS gewaschen und in eine Säule überführt.

4.2 Aufreinigung von Antigen

Zellpellets wurden in 10 Vol NP40-Lyse-Puffer für 30 Min auf Eis lysiert und das Zellysat anschließend bei 100 000 x g in der Ultrazentrifuge für 45 Min abzentrifugiert.

Die Affinitätssäule wurde in dieser Zeit mit 10 Vol NP40-Lysepuffer äquilibriert. Das geklärte Zellysat wurde dann für mindestens 2 h über die Säule zykliert. Nach der Bindung des Antigens an die Säule wurde langsam das Detergens ausgetauscht: zunächst wurde die Säule mit 10 Vol 0,5 % NP40-Puffer gewaschen, dann mit 10 Vol 0,2 % NP40-Puffer und anschließend mit BOG-Waschpuffer. Die Eluation der Säule erfolgte dann in BOG-haltigem Eluationspuffer bei basischem pH in 3 ml-Fractionen, die sofort mit 500 µl 1 M Tris/HCl pH 8,0 neutralisiert wurden. Die antigenhaltigen Fractionen wurden mittels ELISA (siehe II.5) ermittelt und bei -20°C gelagert. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt, die Säule wurde abschließend mit PBS gewaschen und in PBS, 0,1% NaN₃ gelagert.

NP40-Lysepuffer

2 % NP-40

20 mM Tris/HCl pH 8,0

150 mM NaCl

2 mM CaCl₂

2 mM MgCl₂

0,2 % NP40-Puffer

0,2 % NP-40
20 mM Tris/HCl pH 8,0
500 mM NaCl

0,05 % NP40-Puffer

0,05 % NP40
50 mM Tris/HCl pH 8,0
150 mM NaCl
2 mM CaCl₂
2 mM MgCl₂

BOG-Waschpuffer

50 mM BOG
50 mM Tris/HCl pH 8,0
150 mM NaCl
2 mM CaCl₂
2 mM MgCl₂

BOG-Elutionspuffer

50 mM BOG
100 mM Diethylamin pH 11,5
500 mM NaCl

5. ELISA

Der ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) weist Antigen-Antikörper-Komplexe an einer festen Phase durch Kopplung mit einer meßbaren Enzym-Substrat-Reaktion nach. Er wurde hauptsächlich verwendet, um nach einer Antigenaufreinigung die Antigen-enthaltenden Fraktionen zu bestimmen.

Ein Aliquot jeder Fraktion wurde 1 : 10 in TBS verdünnt und über Nacht bei 4 °C an eine 96-Loch-Flachbodenplatte (Falcon) gekoppelt. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die Platte mit 3 % BSA in TBS für 1 h bei RT inkubiert. Zur Detektion des Antigens wurde die Platte für 1 h mit spezifischem Erstantikörper (0,2 µg/ml TBS) bei RT inkubiert und

anschließend dreimal mit Tween-TBS gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper (1:5000 in TBS). Nach erneutem, dreimaligem Waschen mit Tween-TBS wurde die ABTS-Substratlösung zugesetzt und nach Färbung der Positivkontrolle die optische Dichte in einem ELISA-Reader (Titertek, Multiscan Plus) bestimmt.

TBS

10 mM Tris/HCL pH 8,0

150 mM NaCl

Tween-TBS

0,05 % Tween/TBS

ABTS-Substratlösung

86 mM Citronensäure

254 mM Na₂HPO₄

1,8 mM ABTS

0,1 % H₂O₂ (frischzugeben!)

→ pH 4,0

6. SDS-PAGE

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) kann man Molekulargewichte und Reinheitsgrad von Proteinen bestimmen. Das Prinzip dieser Technik beruht auf der Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld nach der Größe ihrer Molekulargewichte. Die Proteine werden durch Behandlung mit Natriumdodecylsulfat (SDS), einem starkem ionischen Detergens, mit einer starken negativen Ladung überzogen. Die Wanderung im elektrischen Feld ist dann nicht mehr von der Eigenladung der Proteine, sondern nur noch von ihrem Molekulargewicht abhängig (Shapiro et al, 1967). Unterschiede in der Wanderung von Proteinen im elektrischen Feld werden durch die Porengröße des Gels bestimmt. Im oberen Sammelgel werden die Proteine bei niedriger Acrylamidkonzentration und pH 6,8 zu einer schmalen Bande konzentriert, um dann im Trenngel bei pH 8,8 und höherer Acrylamidkonzentration nach ihren Molekulargewichten getrennt zu werden. Die

Vorschriften für die Durchführung und das Puffersystem entstammen dem Protokoll von Laemmli (1970).

Die Lösung für das Trenngel wurde zunächst vor der Zugabe von SDS, APS und TEMED unter Vakuum an der Wasserstrahlpumpe entgast. Nach Zusatz der restlichen Komponenten wurde das Trenngel gegossen und zur Begradigung mit einem wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Alkoholgemisch durch mehrmaliges Waschen mit H₂O entfernt und das Sammelgel gegossen, in das sofort der Probenkamm eingesetzt wurde. Nach der Polymerisation wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt. Als Laufpuffer diente 1 x Laufpuffer. Bis zu 40 µl der mit SDS-Probenpuffer versetzten und 5 Min bei 95 ° C erhitzten Proben wurden in die Taschen aufgetragen. Außerdem wurde ein Molekulargewichtsmarker (Rainbowtm, Amersham) aufgetragen. Die Elektrophorese der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA, bis das Bromphenolblau des Probenpuffers die untere Grenze des Gels erreicht hatte.

Acrylamidlösung

30 % Acrylamid

0,8 % N,N'-Methylbisacrylamid

<i>Trenngel (20 ml)</i>	7,5 %	12,5 %
Acrylamidlösung	5 ml	8,3 ml
3 M Tris/HCl pH 8,0	2,65 ml	2,65 ml
H ₂ O	12,1 ml	9,05 ml
10 % SDS	200 µl	200 µl
10 % APS	65 µl	65 µl
TEMED	15 µl	15 µl

Sammelgel (10 ml)

1,35 ml Acrylamidlösung

2,5 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8

6 ml H₂O

100 µl SDS

100 µl APS

10 µl TEMED

5 x Laufpuffer

248 mM Tris

1,9 M Glycin

17 mM SDS

SDS-Probenpuffer

88 mM Sucrose

75 μ M Bromphenolblau

80 mM Tris/HCl pH 8,8

104 mM SDS

7. Western Blot

Der Western Blot ergänzt den von Towbin (1979) beschriebenen Proteinblot um einen Immunoassay. Er diente dem Nachweis membrangebundener Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper im Anschluß an eine SDS-PAGE.

Zunächst wurde ein Elektro-Trockenblot durchgeführt, um die Proteine auf eine Immobilon-Membran (Millipore) zu transferieren. Dazu wurden sechs Filter (Schleicher & Schuell) in Puffer 2 und drei Filter in Puffer 3 getränkt und blasenfrei auf die positive Elektrode einer Blot-Apparatur (Renner) gelegt. Darauf folgte die kurz in Methanol befeuchtete und in Puffer 3 getränkte Membran und anschließend das Gel, welches ebenfalls in Puffer 3 getränkt wurde. Den Abschluß bildeten neun Filter, die in Puffer 1 getränkt waren und in direktem Kontakt zur negativen Elektrode waren. Die Proteine wurden bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 90 Min bei RT geblottet.

Die Effizienz des Proteintransfers wurde mittels Färbung der Membran in einer 10 %igen Ponceau S-Lösung (Sigma) und anschließender Entfärbung in H_2O überprüft. Zur Absättigung der freien, unspezifischen Bindungen wurde die Membran nach dem Blotten mit 5 % Magermilch (Merck, Darmstadt) in TBS für 30 Min bei RT blockiert. Anschließend wurde der Blot mit dem Erstantikörper in einer Konzentration von $0,5 \mu\text{g/ml}$ in 5 % Magermilch/TBS für mindestens 45 Min oder über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,05 % Tween in TBS erfolgte die Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper in einer 1 : 50 000- Verdünnung in 5 % Magermilch/TBS für 40 Min. Abschließend wurde nochmals extensiv mit 0,05 % Tween/TBS gewaschen.

Zur Detektion der Proteinbanden wurde ein Chemilumineszenz Substrat (ECL, Amersham, Freiburg) verwendet. Hierbei wird in einer von der Peroxidase-katalysierten Reaktion, der Oxidation von Luminol in Gegenwart von H₂O₂, Energie in Form von Licht emittiert, und Proteine können durch Auflegen der Membran auf einen Röntgenfilm detektiert werden.

Der Blot wurde für 1 Min mit 0,125 ml Detektionsreagenzien 1 und 2 (1:2) pro cm² Membran inkubiert und anschließend je nach Stärke des erwarteten Signals für eine gewisse Zeit ein Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham, Freiburg) aufgelegt.

Puffer 1

40 µM ε-Amino-Capron-Säure

25 µM Tris

→ pH 9,4

Puffer 2

300 µM Tris

→ pH 10,4

Puffer 3

25 µM Tris

→ pH 10,4

8. Präparation von DIGs

DIGs sind „detergent-insoluble glycosphingolipid enriched membrane microdomains“ (siehe Einleitung). Die DIGs können aufgrund ihrer Unlöslichkeit in Detergenzien wie NP40 oder Triton X-100 durch Dichtegradientenzentrifugation präpariert werden.

Je nach Größe der Zellen wurden 2×10^7 (bei präB-Zelllinien) bis 2×10^8 (bei naiven Zellen) Zellen in 500 µl Lysis Puffer für 30 Min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde mit einem äquivalenten Volumen 85 % Saccharose-Lsg. in Wasser (w/v) gemischt und auf den Boden eines SW60-Zentrifugenröhrchens pipettiert. Ein Stufengradient wurde aufgebaut, indem diese untere Schicht mit 3 ml 35 % Saccharose-Lsg. (w/v) in Wasser und anschließend mit 500 µl 5 % Saccharose-Lsg. in Wasser (w/v) überschichtet wurde. Der Gradient wurde für 18 h bei 200 000 x g und 4°C in einem Beckmann SW60-Rotor zentrifugiert. Das Ernten erfolgte in 500 µl-Fraktionen vom Top des Gradienten, wobei sich die DIG-Fraktion in der 35/5 %-

Interphase befand. Je nach Experiment wurden die Fraktionen direkt verwendet, organisch gefällt, oder 1:10 mit H₂O verdünnt und das enthaltene Protein bei 200 00g für 1 h bei 4 °C in einem SW60-Rotor pelletiert.

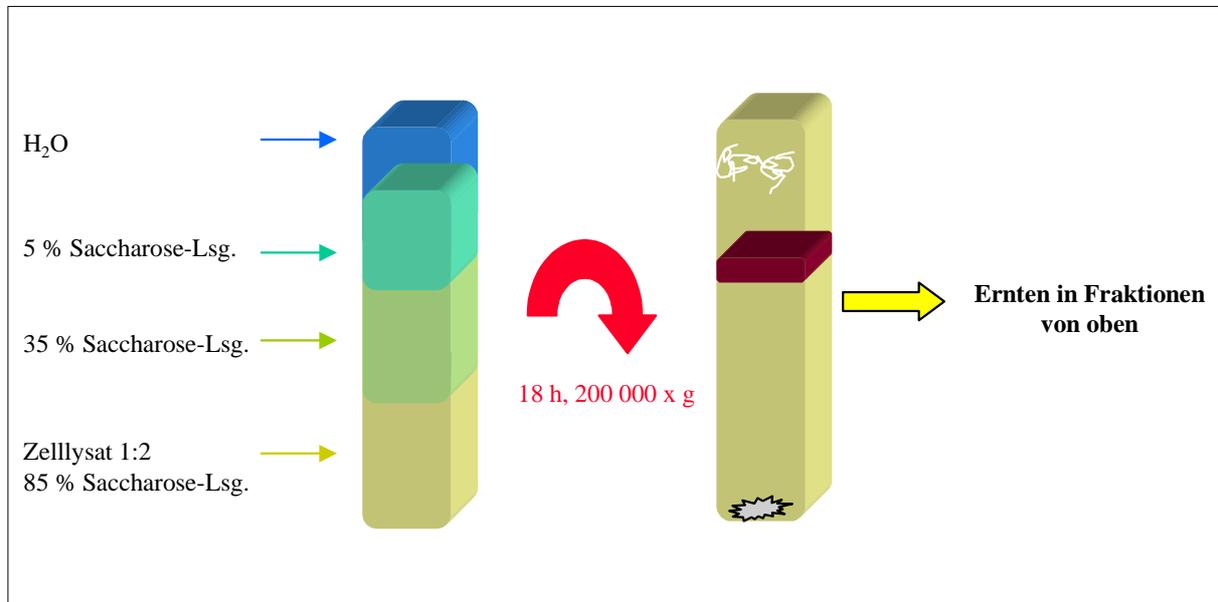


Abb. 8 zeigt die Präparation der DIGs. Zelllysat wird mit 85%iger Saccharose-Lsg. auf eine Saccharose-Konzentration von 42,5 % eingestellt und mit 35%iger und 5%iger Saccharose-Lsg. überschichtet. Das Röhrenchen wird dann mit Wasser aufgefüllt und für 18 h in der Ultrazentrifuge bei 200 000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Ernten erfolgt von oben in 500 µl-Fractionen, die interessante DIG-Fraktion erscheint als „Ring“ am 35 zu 5% Saccharose-Übergang.

9. Präparation von Membran- und Zytosolfractionen

Zytosolische Proteine und zelluläre Membranen wurden aus postnuklearem Überstand nach der Methode von Walter und Blobel präpariert. Die Zellen wurden aufgenommen in Puffer A und die Zellmembranen durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem N₂ und im Wasserbad bei 37°C, zerstört. Die Zellkerne wurden bei 1000 x g für 10 Min abzentrifugiert und der postnukleare Überstand wurde gesammelt. Der Überstand wurde auf ein 45 % Saccharose-Kissen in Puffer A (w/v) gegeben und für 30 Min bei 140 000 x g in einem Beckmann 50.2Ti-Rotor zentrifugiert. Das Pellet, welches die mikrosomalen Membranen enthielt, wurde in Puffer A resuspendiert und der Überstand wurde als zytosolische Fraktion verwendet.

Puffer A

250 mM Saccharose

50 mM Triethanolamin pH 7,5

50 mM KaAcetat

6 mM Mg(Acetat)₂

1 mM EDTA

1 mM DTT

500 μ M PMSF

10. Proteinfällung

Proteine wurden durch organische Lösungsmittel gefällt. Dazu wurden die Proteinlösungen mit 4 Vol Methanol, 1 Vol Chloroform und 3 Vol H₂O versetzt und gut gemischt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation im Ausschwingrotor bei 500 x g für 20 Min ohne Bremse. Nach der Zentrifugation waren deutlich zwei Phasen mit der proteinhaltigen Interphase erkennbar. Die obere Phase wurde verworfen, 6 Vol Methanol zugesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde nochmals wie oben zentrifugiert, das Proteinpellet wurde am Boden sichtbar. Das Proteinpellet wurde in einem Exikator getrocknet und je nach Verwendung in Puffer aufgenommen.

11. Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Proteinbestimmung wurde der Bradford-Kit der Firma Biorad verwendet. Dabei wurde die Bradfordlösung 1 zu 5 mit H₂O verdünnt. Von der zu untersuchenden Proteinlösung wurden 5 μ l in eine 96-Loch-Platte (Greiner) gegeben und mit 200 μ l der verdünnten Bradford-Lösung inkubiert. Nach ca. 5 Min wurde die Extinktion bei $\lambda = 595$ nm im ELISA-Photo-Reader gemessen. Aus einem Vergleich mit einem Proteinstandard ließ sich dann die Proteinkonzentration bestimmen.

12. In vitro-Phosphorylierungsexperimente

Zur Untersuchung der in vitro-Phosphorylierung wurden 1×10^7 Thymozyten pro Ansatz eingesetzt. Die Zellen wurden einmal in Hepes/Saline gewaschen und pelletiert. Zur

Aktivierung wurden die Zellen in 20 µl Hepes/Saline unter Zusatz der jeweiligen Aktivatoren aufgenommen. Zur Aktivierung wurden verwendet: monoklonale Antikörper in einer Konzentration von 15 µg/ml, PMA in einer Konzentration von 50 ng/ml oder Mg²⁺/EGTA in einer Konzentration von 5 mM/1mM. Die Aktivierung erfolgte für die angegebenen Zeiträume bei 37 °C. Anschließend wurde sofort eiskalter Lysispuffer (mod. RIPA-Puffer) zugegeben und die Zellen für 5 Min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Lysat bei 13 000 rpm bei 4 °C in einer Heraeus-Tischzentrifuge für 10 Min geklärt. Das Lysat wurde dann mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und zur Western-Blot-Analyse im SDS-Gel aufgetrennt. Die Western-Blot Analyse erfolgte mittels des pTyr-spezifischen monoklonalen Antikörpers 4G10 (UBI).

Hepes Saline

150 mM NaCl

2 mM Hepes

modifizierter RIPA-Puffer

50 mM Tris/HCl, pH8,0

125 mM NaCl

0,1 % SDS

0,5 % Deoxycholat

1 % Triton X-100

1 mM PMSF

20 mM Paraphenylphosphat

10 mM Natriumpyrophosphat

10 µg/ml Aprotinin

10 µg/ml Pepstatin

10 µg/ml Leupeptin

10 mM Na₃VO₄

III. Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Methoden wurden zur Konstruktion von CD24-Molekülen ohne GPI-Anker verwendet.

1. PCR

Mit Hilfe der PCR (Saiki et al, 1988) können spezifische DNA-Abschnitte mittels definierter Oligonucleotide, sog. Primer, amplifiziert werden. Nach Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA erfolgt die Anlagerung (Annealing) der Primer an die einzelsträngige DNA. Dieser kurze Doppelstrang wird durch eine spezielle hitzebeständige Polymerase (Pfu Turbo-Polimerase) verlängert, wodurch aus einem Doppelstrang zwei neue synthetisiert werden. Bei zyklischer Wiederholung dieser Reaktionsfolge kann der jeweilige DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt werden.

In einem 50 µl-Ansatz wurden 100 – 150 ng cDNA, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 5 µl 10x Nucleotidgemisch (entsprechend 200 µM aller vier Desoxynucleotide), jeweils 30 pM der den interessanten DNA-Abschnitt am 3`- und 5`-Ende flankierenden Primer und 2 U Taq-Polimerase (Pfu-Turbo, Stratagene) gemischt und mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt. Zum Schutz vor Verdunstung wurde der Ansatz mit Mineralöl (Sigma) überschichtet. Der Reaktionszyklus umfaßte im allgemeinen die Denaturierung der DNA für 3 Min bei 95 °C, das Annealing der Primer erfolgte für 1 Min, wobei hier die Temperatur einige Grad unter der Schmelztemperatur der Primer gehalten wurde. Daran schloß sich die Reaktionszeit der Polymerase für 2 Min bei 72 °C an. Dieser Zyklus wurde 35mal wiederholt. Die PCR wurde in einem Robocycler von Stratagene in 0,5 ml Eppendorfröhrchen durchgeführt.

Sollte das Reaktionsprodukt weiter für Klonierungen verwendet werden, erfolgte eine Fragmentisolierung aus dem Agarosegel zur Entfernung überschüssiger Primer, Nebenprodukte und der Polymerase (siehe III.5.2).

Verwendete Primer:

HSA rev. 159	CCCTCTGGTGGTAGCGTTACT
5'pcDM8	TAATACGACTCACTATAGGG
3'pcDM8	TAAGGTTTCCTTCACAAAG
3'Xho	CTCGAGCTATTCTAGGGCTACTGCAGGATTG
5'L-Selectin s1061	CCCCTCTTCATTCCAGTGGCA
L1 TM sense	TCCGAGGGCTGGTTCATCGCCTTTGTC

2. Auftrennung von PCR-Produkten im Agarosegel

Die PCR-Produkte wurden in 1-1,5%igen Agarosegelen (Agarose: Life Technologies) in TAE-Puffer aufgetrennt. Der Gellösung wurden 0,1µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die DNA wurde einem entsprechenden Volumen 6x Probenpuffer vermischt und aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 – 100 V. Als Größenstandard dienten DNA-Molekulargewichtsmarker (MBI-Fermentas) entsprechend der zu erwartenden Bande. Die DNA konnte durch Einlagerung des Ethidiumbromids in die Doppelhelix unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht werden.

Probenpuffer (6x):

10 mM	Na ₂ HPO ₄ xH ₂ O, pH 6.6
50 %	Glycerol
0.05 %	Bromphenolblau
0.05 %	Xylencyanol

TAE-Puffer (50x):

242 g	Tris
57.1 ml	Eisessig
100 ml	0.5M EDTA, pH 8.0
ad 1000 ml H ₂ O, pH 8.5	

3. Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktionsanalyse von DNA diente entweder dem Nachweis bestimmter DNA-Fragmente oder dem Umklonieren von DNA-Fragmenten (siehe III.5).

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten fand in einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl statt. Dabei wurden mindestens 2 U Enzym/µg DNA unter den dem jeweiligen Enzym entsprechenden Pufferbedingungen eingesetzt, wobei der Verdau in der Regel für zwei Stunden bei 37 °C durchgeführt wurde. Beachtet wurde dabei, daß auf je 10 µl Reaktionsansatz nur 1 µl Enzym eingesetzt wurde, um eine inhibitorische Wirkung des Glycerins im Enzymverdünnungspuffer zu neutralisieren.

Anschließend wurden die verdauten DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt und das Bandenmuster mit dem anhand von Restriktionsenzymsschnittkarten ermittelten Schnittmuster verglichen.

4. DNA-Fällung mit Ethanol

Die DNA wurde mit 0.3M NaAc (Endkonzentration) und mit dem zweifachen Volumen eiskaltem, absolutem Ethanol versetzt und für mindestens 30 Min bei -70°C gefällt. Nach Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 13 000 rpm für 30 Min wurde das Pellet mit 70 %-igem Ethanol für 15 Min bei -70°C inkubiert und erneut für 30 Min bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA unter Vakuum getrocknet und in TE-Puffer oder H_2O gelöst.

5. Umklonierung von DNA-Fragmenten zwischen zwei Vektoren

Für die Transfektion von eukaryontischen Zellen mußte die zu transfizierende DNA, die meist in einem prokaryontischen Vektor vorlag, in einen geeigneten Vektor kloniert werden, der in einer eukaryontischen Zelle transkribiert und translatiert werden konnte.

Es wurden die folgenden Vektoren verwendet:

<i>PCR Blunt</i>	Klonierungsvektor für PCR-Produkte; ColE1 ori, lacZ, Zeozin ^R , Kanamycin ^R (Zero Blunt TM PCR Cloning Kit, Invitrogen)
<i>pCDM8</i>	Vektor zur Transfektion eukaryontischer Zellen, CMV Promotor, SV 40 ori (Invitrogen)
<i>pCDNA3</i>	Vektor für stabile und transiente Transfektion eukaryontischer Zellen; CMV Promotor, SV 40 ori, Neomycin ^R (Invitrogen)

5.1 Ausschneiden der DNA aus einem Vektor

Die gewünschte DNA (Insert) wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen aus dem prokaryontischen Vektor herausgeschnitten (III.3). Nach der Gelelektrophorese im Agarosegel konnte die Insert-Bande aus dem Gel eluiert werden. Parallel wurde der eukaryontische Vektor mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten und ebenfalls über eine Geleluatation aufgereinigt.

5.2 DNA-Isolation aus einem Agarose-Gel

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe der Reagenzien des QIAquick-Gel-Extraktionskits (Qiagen).

Die interessante DNA-Bande wurde unter langwelligem UV-Licht aus dem Gel geschnitten und in einem Eppendorfröhrchen mit dem dreifachen Volumen Puffer QG für 10 Min bei 50 °C aus dem Gel gelöst. Um die DNA an eine Matrix binden zu lassen, wurde der Ansatz auf eine QIAquick-Säule gegeben und für eine Min bei 13 000 rpm in der Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule einmal mit 500 µl Puffer QG und einmal mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Um Alkoholreste zu entfernen, wurde die Säule noch einmal bei 13 000 rpm in der Tischzentrifuge für eine Min zentrifugiert und dann auf ein frisches Eppendorfröhrchen gegeben. Nun wurden 30-40 µl H₂O auf die Säule gegeben, für eine Min inkubiert und durch eine weitere Zentrifugation die DNA von der Säule eluiert. Ein Aliquot wurde zur Überprüfung der Reinheit und Menge auf ein Agarosegel gegeben.

5.3 Ligation von DNA-Fragmenten

5.3.1 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Bevor die aufgereinigten PCR-Produkte ligiert werden konnten, mußten diese zunächst phosphoryliert werden. Dazu wurde die aus dem Agarose-Gel aufgereinigte DNA in getrennten Reaktionen in einem 50 µl-Ansatz mit 5 µl 10x Polynucleotidkinase-Puffer, 0,5 µl 0,1 M ATP-Lösung und einem entsprechenden Volumen H₂O vermischt und für 5 Min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl T₄-Polynucleotidkinase(Biolabs) hinzugegeben und die PCR-Produkte für 45 Min bei 37 °C phosphoryliert.

5.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der DNA-Ligation wurden entweder geschnittene Inserts und Vektoren oder direkt PCR-Produkte mit einem dafür besonders geeigneten Vektor (PCR Blunt) zusammengefügt. Nach Aufreinigung der DNAs wurden in etwa äquimolare Mengen des Vektors und des Inserts mit 1 µl T₄-Ligase versetzt, 1 µl 10x Ligase-Puffer und 1 µl 10 mM ATP in einem Gesamtvolumen von 10 µl für mindestens 4 h bei 16 °C im Wasserbad ligiert. Anschließend wurde das neu entstandene Fusionsprodukt in einer Fusions-PCR mit entsprechenden Primern amplifiziert. Danach erfolgte die Transformation der Bakterien mit dem Ligationsansatz.

6. Herstellung transmembraner CD24-Konstrukte

Es wurden zwei verschiedene CD24-Konstrukte hergestellt: CD24-L1 und CD24-L-Selektin. Bei diesen Konstrukten wurde jeweils der Teil von CD24, der für den GPI-Anker codiert gegen den transmembranen Anteil des jeweilig anderen Moleküls ausgetauscht. Als Ausgangsprodukt diente für beide Konstrukte cDNA von murinem CD24. Die cDNA lag im Vektor pCDM8 vor. Der interessante Teil von CD24 (siehe Abb. 9) wurde mit Hilfe der Primer 5' pCDM8 und HSA rev159 durch PCR aus der cDNA amplifiziert.

Die cDNA, aus der sich die beiden Fusionspartner ergaben, das humane L-Selektin und murine L1 lagen ebenfalls im pCDM8-Vektor und wurden von Herrn K. Kishimoto bzw. Herrn Vance Lemmon zur Verfügung gestellt. Die für die transmembranen Teile kodierenden Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert. Für den transmembranen Teil von L1 wurden die Primer L1 TM sense und 3' Xho verwendet und für den transmembranen Teil von L-Selektin die Primer 5' L-Selectin s1061 und 3' pCDM8. Abb. 9 zeigt die Aminosäure-Sequenzen der zur Fusion eingesetzten Proteinteile.

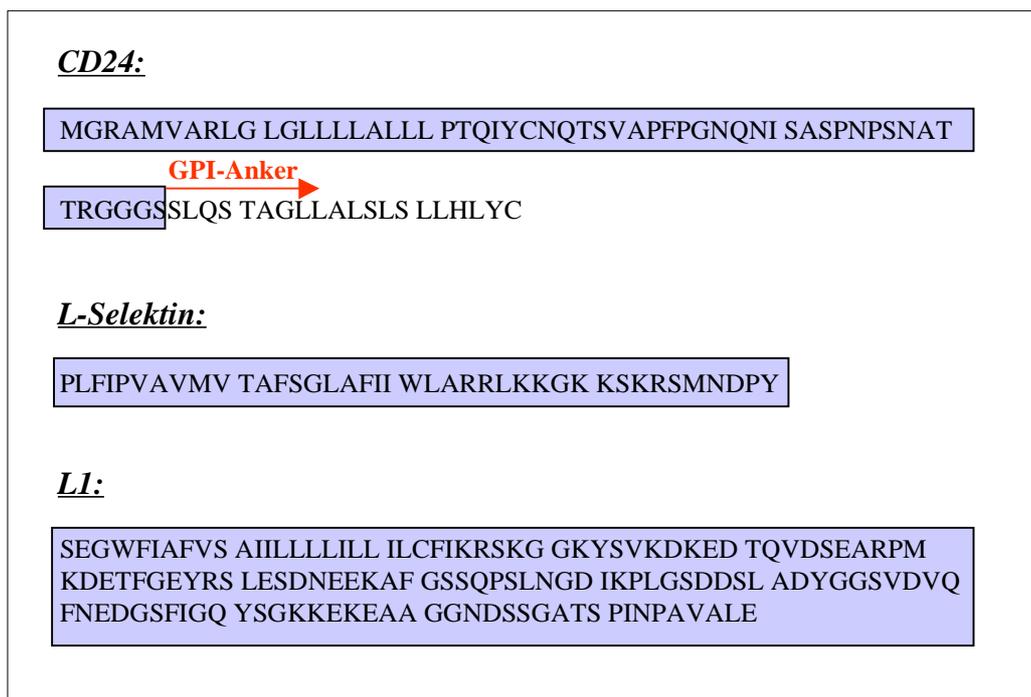


Abb. 9 Aminosäuresequenzen der zur Herstellung der chimären CD24-Proteine eingesetzten Moleküle bzw. Molekülteile vom N-Terminus zum C-Terminus. Vom murinen CD24 ist die Aminosäuresequenz des gesamten kodierenden Bereichs gezeigt. Vom humanen L-Selektin und vom murinen L1 sind nur die Sequenzen des transmembranen und zytoplasmatischen Teils dargestellt. Die zur Fusion verwendeten Fragmente sind hellblau unterlegt.

Die erhaltenen Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt und wie oben beschrieben aus dem Gel eluiert. Nach der Phosphorylierung (s.o.) wurden die Fragmente ligiert und durch PCR amplifiziert. Zur Fusions-PCR wurden folgende Primer eingesetzt: im Falle des CD24-L1-Konstrukts: 5'pCDM8 und 3'Xho und im Fall des CD24-L-Selectin-Konstrukts 5'L-Selectin s1061 und 3'-pCDM8. Da die erhaltenen DNA-Fusionsprodukte sog. "blunt-ends" hatten, wurden sie zunächst in den pCR-Blunt-Vektor kloniert. Nach der Sequenzierung, die von der Firma Toplab in Martinsried durchgeführt wurde, wurden die Produkte in den pCDNA3-Vektor umkloniert. Die Umklonierung erfolgte in beiden Fällen über die Xho und HindIII-Schnittstellen der Vektoren.

7. Transformation von Bakterien

Die Vermehrung von Plasmid-DNA erfolgte in geeigneten Stämmen von *Escherichia coli*. Die Transformation erfolgte durch Hitzeschock der Bakterien, die zuvor für die Aufnahme von DNA entsprechend vorbereitet werden mußten. Der folgende Bakterienstamm wurde verwendet:

E. coli TOP10/P3 F⁻, *mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, *deoR*, *recA1*, *araD139*, $\Delta(ara-leu)7697$, *galU*, *galK*, *rpsL*, *endA1*, *nupG*, [P3: Kan^R, Amp^R(am), Tet^R(am)]

7.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation durch Hitzeschock (INOUE et al, 1990)

Hitzeschock ist eine Methode, bei der fremde DNA durch einen Temperaturschock in Bakterien transferiert werden kann. Dafür wurden Bakterien auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Davon wurde eine Einzelkolonie in 20 ml LB-Medium angeimpft und bei 37 °C über Nacht im Schüttler inkubiert. 1ml dieser Vorkultur wurde in 200 ml LB-Medium gegeben und bis zu einer optischen Dichte von 0.6 bei 600 nm kultiviert. Anschließend wurden 600 ml vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und weitere 20 Min bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden die Zellen bei 6000 rpm in der Heraeus Minifuge für 5 Min bei 0 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert, für 1 h auf Eis inkubiert und erneut wie oben beschrieben abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann vorsichtig in 5 ml einer 10%-igen Glycerinlösung mit 100 mM CaCl₂ resuspendiert und

die Zellsuspension zu je 100 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

LB-Medium:

10 g Trypton
5 g Yeast Extract
10 g NaCl ad 1000 ml H₂O, pH 7.0
für Platten: 15 g Agar pro 1000ml

7.2 Transformation kompetenter Bakterien durch Hitzeschock

Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA (2-5 µl des Ligationsansatzes) für 30 Min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für exakt 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad inkubiert und sofort für 2 Min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1ml SOC-Medium, das auf 37°C vorgewärmt worden war, wurden die Bakterien eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Daraufhin wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bakterien, die durch Aufnahme des Vektors die entsprechende Antibiotikaresistenz erworben hatten, bildeten Kolonien, die gepickt, expandiert und zur Plasmid-DNA-Isolierung genutzt werden konnten.

SOC-Medium:

20 g Trypton
5 g Yeast Extract
0.5 g NaCl
10 ml 250 mM KCl
10 ml 1 M MgCl₂
10 ml 1 M Glukose ad 1000 ml H₂O, pH 7.0

Verwendete Antibiotika:

Ampicillin 50 µg/ml Medium
Tetrazyklin 480 µl/100ml Medium aus 25 mg/10 ml Stocklösung in 50 % Ethanol

8. Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte entsprechend der erforderlichen Menge über eine Minipräparation (Ausbeute etwa 30 µg Plasmid-DNA) oder ein Maxipräparation (Ausbeute etwa 800 µg Plasmid-DNA). Dafür wurde jeweils eine Einzelkolonie in der zur Präparation erforderlichen Menge LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und über Nacht im 37 °C-Schüttler inkubiert.

8.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Minipräparation von Plasmid-DNA wurden die Reagenzien des ClearCut™ Miniprep Kit von Stratagene eingesetzt. 1.5ml Bakteriensuspension einer 2 ml Übernachtskultur wurden bei 6000 rpm in der Heraeus Tischzentrifuge für 2 Min pelletiert und in drei Tropfen Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von fünf Tropfen Puffer 2 folgte eine fünfminütige Inkubation bei RT, um die Zellen zu lysieren. Das Lysat wurde durch fünf Tropfen Puffer 3 neutralisiert und für 5 Min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Plasmid-haltige Überstand in ein neues Eppendorfröhrchen überführt und mit 15 µl Kieselharz gemischt, um die Plasmid-DNA zu binden. Dieses Gemisch wurde auf eine Säule gegeben und bei der darauffolgenden Zentrifugation durch einen Filter zurückgehalten. Das Plasmid-tragende Harz wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen und die DNA anschließend mit 50 µl TE-Puffer eluiert.

Puffer 1:

50 mM	Tris/HCL, pH 7.5
10 mM	EDTA
50 mg/ml	RNase A

Puffer 2:

0.2 M	NaOH
1 % (w/v)	SDS

Puffer 3:

Guanidin-HCl-Lösung

Waschpuffer:

5 mM	Tris/HCl, pH 7.5
50 mM	NaCl

1.25 mM	EDTA
75 % (v/v)	Ethanol

8.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Für die Maxi-Präparation der Plasmid-DNA wurden die Reagenzien von Qiagen verwendet. Maxi-Präparationen von Plasmid-DNA waren nötig, um genügend Material für spätere Transfektionen zu erhalten.

500 ml einer Über-Nachtkultur wurden pelletiert (GSA-Rotor, 4°C, 6000 rpm, 5 Min) und in 10 ml Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer 2 zur Lyse der Bakterien wurde der Ansatz vorsichtig geschüttelt und nicht länger als 5 Min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Puffer 3 zur Neutralisation zugegeben, vorsichtig geschüttelt und 20 Min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (SS34-Rotor, 4°C, 45 Min, 16 000 rpm) wurde der klare Überstand auf eine Qiagen-Säule 500 pipettiert, die zuvor mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert worden war. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA anschließend mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Durch Zugabe des 0.7-fachen Volumens Isopropanol wurde die DNA präzipitiert. Die Plasmid-DNA wurde pelletiert (SS34-Rotor, 4°C, 30 Min, 11000 rpm) und mit 5 ml 70%-igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 500 µl TE-Puffer gelöst.

Puffer 1:

50 mM	Tris/HCl, pH 7.5
10 mM	EDTA, pH 8.0
100 µg/ml	RNAse A

Puffer 2:

0.2 M	NaOH
1 % (w/v)	SDS

Puffer 3:

3 M	KAc, pH 5.5
-----	-------------

QBT-Puffer:

750 mM	NaCl
--------	------

50 mM	MOPS, pH 7.0
15 %	Ethanol
0.15 %	Triton X-100

QC-Puffer:

1 M	NaCl
50 mM	MOPS, pH 7.0
15 %	Ethanol

QF-Puffer:

50 mM	Tris/HCl, pH 8.5
1.25 M	NaCl
15 %	Ethanol

9. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm gegen TE-Puffer. Bei einer Plasmid-DNA-Lösung entspricht eine optische Dichte von 1.0 einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml.

C. Ergebnisse

1. Die Rolle der Rafts bei der Regulation der Zelladhäsion

Die Rafts der Zellmembran sind in T-Lymphozyten sehr stark in den Aktivierungsprozeß involviert (Montixi et al, 1998; Xavier et al, 1998; Zhang et al, 1998; Viola et al, 1999; als Review siehe Janes et al, 2000). Ein Einfluß der Membranmikrodomänen auf die T-Zell-Adhäsion konnte bislang nicht nachgewiesen werden.

CD24 sollte aufgrund seiner Struktur ein typisches Raft-Molekül sein. Vorausgehende Studien (Ruppert et al, 1995) haben gezeigt, daß Antikörper gegen das GPI-geankerte Molekül CD24 in monozytären Tumorzelllinien Integrine aktivieren können. Der genaue Mechanismus wurde allerdings nicht aufgeklärt. Es blieb zudem unklar, ob dieser Weg auch bei naiven Zellen funktionell ist und möglicherweise ein genereller Mechanismus zugrunde liegt. Zu Beginn dieser Arbeit bestand die Aufgabe darin zu untersuchen, ob auch in einem T-Zell-System Antikörper gegen das GPI-geankerte CD24 eine Aktivierung von Integrinen in der Zelladhäsion hervorrufen. Als Untersuchungsobjekt wurden Thymozyten herangezogen, da sie CD24 in hohem Maße exprimieren. Prominentester Vertreter der Integrine auf diesen Zellen ist das LFA-1, welches an seine Bindungspartnern ICAM-1, -2 und -3 binden kann.

1.1 Antikörper gegen CD24 induzieren die Bindung von Thymozyten an ICAM-1

Der Einfluß von Antikörpern gegen CD24 auf den Aktivierungszustand des LFA-1 Integrins wurde in spezifischen Bindungsversuchen untersucht. Hierzu wurde zunächst ICAM-1 aus ESb 289-Zell-Lysat gereinigt. Die Aufreinigung erfolgte affinitätschromatographisch an einer Anti-ICAM-1-Säule. Abb. 10 zeigt ein typisches Reinigungsprofil nach Eluation der Säule im nachfolgenden ELISA zur Detektion des Antigens.

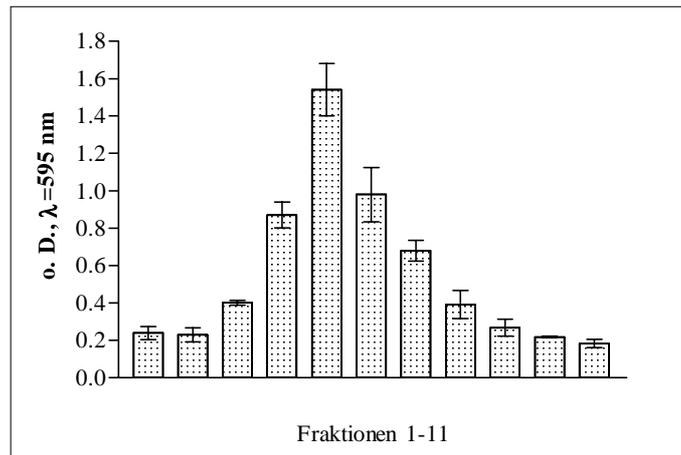


Abb. 10 ELISA-Profil der Fraktionen nach affinitätschromatographischer Aufreinigung von ICAM-1 aus ESb 289-Zellen.

Die proteinhaltigen ELISA-Fraktionen wurden zusammengefaßt und 8-Loch-Kammern mit einer 1 zu 10-Verdünnung des aufgereinigten ICAM-1 beschichtet. Die Thymozyten wurden für 30 Min bei RT daran binden lassen. Zuvor wurden die Zellen für 5 Min mit den aktivierenden Agenzien inkubiert und diese auch während des gesamten Bindungsversuchs auf den Zellen belassen. Abbildung 11 zeigt das Ergebnis eines solchen Bindungsversuchs. Die Bindungsversuche wurden mit Thymozyten aus normalen C57/Bl6-Mäusen (CD24^{+/+}) und mit Thymozyten aus CD24 k.o. (CD24^{-/-}) Mäusen parallel durchgeführt. Die CD24^{+/+} Thymozyten konnten durch Antikörper gegen CD24 in ihrer Bindung an das ICAM-1 aktiviert werden. Der CD24 Antikörper wurde in einer Konzentration von 15 µg/ml eingesetzt. Hier gezeigt sind Daten mit dem CD24-spezifischen, monoklonalen Antikörper M1.69, Daten mit anderen CD24-spezifischen Antikörpern wie dem mAk 79 sind äquivalent und werden nicht gezeigt. Bei den Zellen aus CD24 k.o. Tieren ist aufgrund des fehlenden Antigens keine Aktivierung durch Antikörper gegen CD24 möglich. Die Aktivierbarkeit von LFA-1 mit Mg²⁺/EGTA ist ein wichtiger in der Literatur beschriebener Weg (Stewart et al, 1998) und wurde hier als Positivkontrolle verwendet. Beide Zelltypen lassen sich mit Mg²⁺/EGTA in einer Konzentration von 5 mM/1 mM in ihrer Bindung an ICAM-1 aktivieren, das Fehlen von CD24 stört nicht die Funktionalität des Integrins. Unspezifische Bindung wurde an Ovalbumin getestet und durch die beschriebenen Aktivierungsmechanismen nicht beeinflußt.

Die Integrin-Aktivierung durch Antikörper gegen CD24 ist spezifisch für LFA-1. In Bindungsversuche auf α₄-Integrin-spezifischen Substraten wie VCAM oder FN40 konnte eine

Aktivierung des α_4 -Integrins nicht festgestellt werden, obwohl α_4 in ausreichendem Maße auf Thymozyten exprimiert wird (Daten nicht gezeigt).

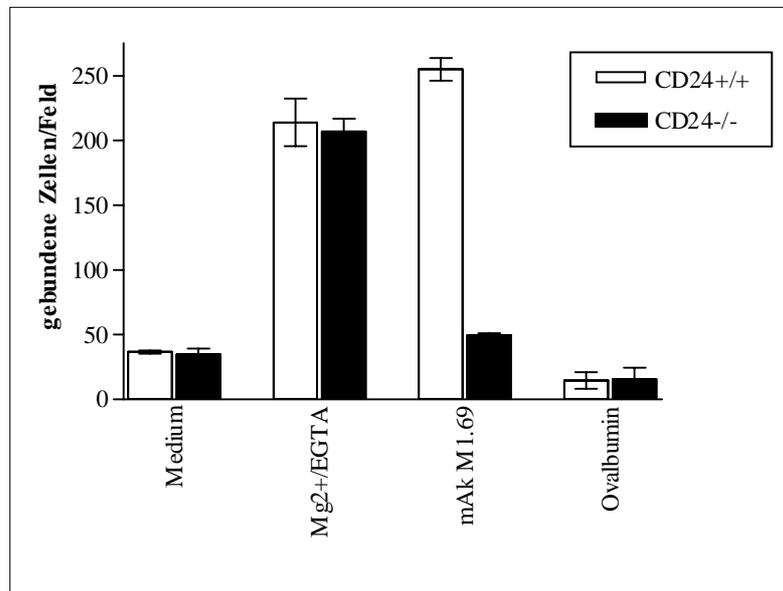


Abb. 11 Bindung von CD24^{+/+} und CD24^{-/-} Thymozyten an ICAM-1. Links ist die Medium-Kontrolle ohne Aktivierung der Zellen gezeigt; daneben sind Zellen nach Aktivierung durch 5 mM/1 mM Mg²⁺/EGTA und durch 15 μ g/ml mAk M1.69 gegen CD24 zu sehen. Die Thymozyten wurden jeweils für 5 Min bei RT mit den aktivierenden Agenzien vorinkubiert und diese während des gesamten Versuchs auf den Zellen belassen. Die Bindung der Zellen erfolgte für 30 Min bei RT. Unspezifische Bindung wurde an Ovalbumin gemessen und durch die verschiedenen Aktivierungsmechanismen nicht beeinflusst.

1.2 Die CD24 induzierte Adhäsion ist vermittelt durch LFA-1

Um nachzuweisen, daß die Bindung der Zellen durch das LFA-1 Integrin und ICAM-1 vermittelt war, wurden Inhibitionsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit Antikörpern gegen LFA-1 (mAk Tib213) und ICAM-1 (mAk YN.1/1.7) für 5 Min vorinkubiert und die Antikörper auch während des anschließenden Bindungsversuchs auf gereinigtem ICAM-1 in der Zellsuspension belassen. Die Antikörper wurden in Konzentrationen von 10 bis 40 μ g/ml eingesetzt. Der aktivierende Antikörper gegen CD24 (mAk M1.69) wurde in einer Konzentration von 15 μ g/ml zur Vorinkubation eingesetzt und ebenfalls bei den Zellen belassen.

Abb. 12 zeigt, daß die durch CD24 induzierte Zelladhäsion in dosisabhängiger Weise durch beide Antikörper blockiert werden konnte. Antikörper gegen CD24 induzieren also die

Bindung durch eine Aktivierung des LFA-1-Integrins. Die Bindung an Ovalbumin wurde weder durch die Inhibition noch die Aktivierung der Zellen beeinflusst.

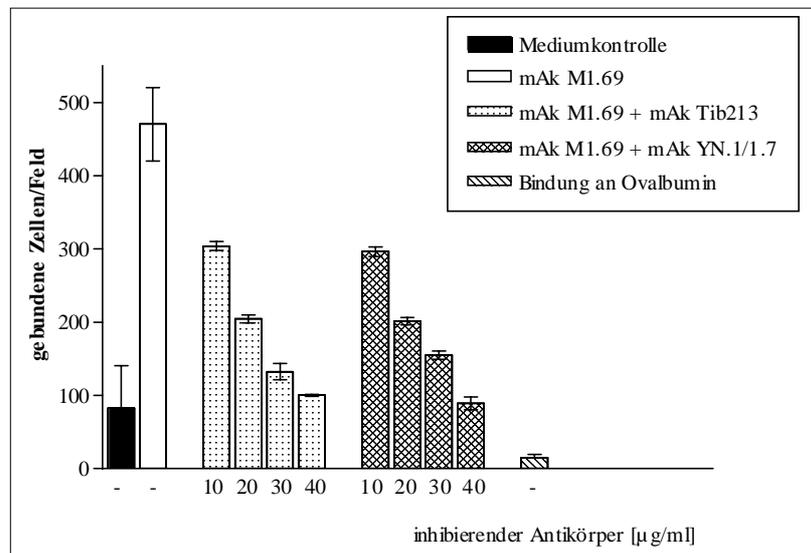


Abb. 12 Bindung von Thymozyten an immobilisiertes ICAM-1. Der aktivierende Antikörper gegen CD24 (mAk M1.69) lag in einer Konzentration von 15 µg/ml vor, die inhibierenden Antikörper gegen LFA-1 (mAk Tib 213) und ICAM-1 (YN.1/1.7) wurden entsprechend den Angaben titriert. Sowohl der aktivierende als auch die beiden inhibierenden Antikörper wurden für 5 Min bei RT vorinkubiert und während des gesamten Bindungsversuchs auf den Zellen belassen. Die Bindung der Zellen erfolgte für 30 Min bei RT.

1.3 Antikörper gegen transmembrane Moleküle können LFA-1 nicht aktivieren

In weiteren Bindungsversuchen wurden die Thymozyten mit Antikörpern gegen verschiedene transmembrane Oberflächenantigene vorinkubiert und der Effekt auf die LFA-1 vermittelte Bindung untersucht.

Es wurden Antikörper gegen folgende transmembrane Moleküle gewählt: CD2 (mAk 12-15), CD45 (mAk 30G12), CD3 (mAk 500A2) und in einem Bereich von 5 bis 50 µg/ml titriert (Abb. 13).

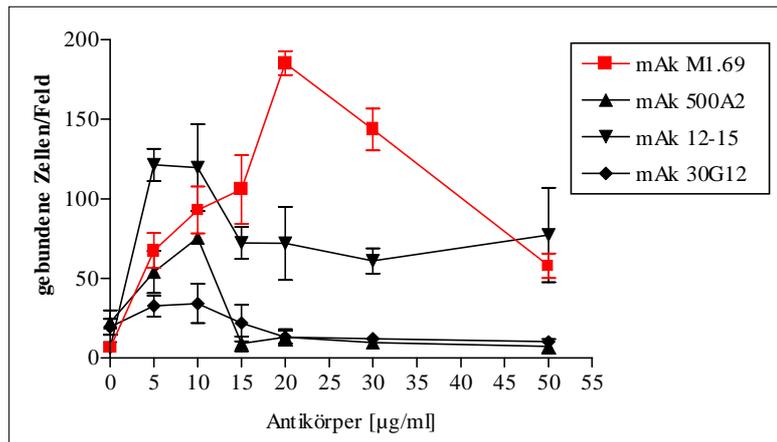


Abb. 13 Bindung von CD24^{+/+} Thymozyten an immobilisiertes ICAM-1. Die Zellen wurden für 5 Min bei RT mit Antikörpern gegen CD24 (mAk M1.69), CD3 (mAk 500A2), CD2 (mAk 12-15) und CD45 (mAk 30G12) vorinkubiert und die Antikörper während des Bindungsversuchs auf den Zellen belassen. Die Bindung erfolgte für 30 Min bei RT. Die Antikörper wurden in den angegebenen Konzentrationen titriert.

Abb. 13 zeigt, daß keiner der eingesetzten Antikörper gegen Moleküle mit transmembranem Anteil eine signifikante Aktivierung der Zelladhäsion erzielen konnte, obwohl die entsprechenden Antigene laut FACS-Analyse in ausreichender Menge auf den Zellen exprimiert wurden. Allein der Antikörper gegen CD2 zeigte im unteren Konzentrationsbereich eine schwache Aktivierung.

Erstaunlicherweise konnte ein Antikörper gegen das ebenfalls GPI-geankerte Molekül Thy1 (mAk G7) eine Aktivierung ähnlich wie der CD24-Antikörper erzielen, allerdings war hier eine viel höhere Konzentration erforderlich (Abb. 14).

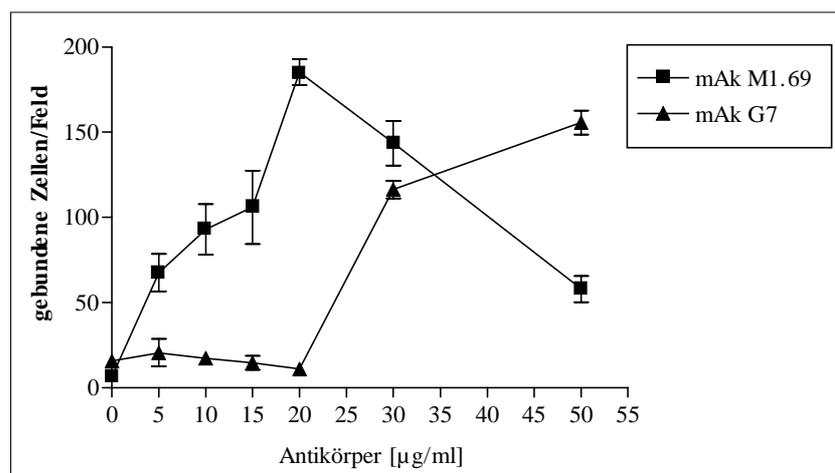


Abb. 14 Bindung von CD24^{+/+} Thymozyten an immobilisiertes ICAM-1. Die Zellen wurden für 5 Min bei RT mit Antikörpern gegen CD24 (mAk M1.69) und gegen Thy1 (mAk G7) vorinkubiert und die Antikörper während des Bindungsversuchs auf den Zellen belassen. Die Bindung wurde für 30 Min bei RT zugelassen.

1.4 CD24 und LFA-1 kolokalisieren in den Membranrafts

Antikörper gegen CD24 und Thy1 können, in schwächerem Ausmaß, eine Aktivierung des LFA-1 Integrins auf der Zelloberfläche von Thymozyten herbeiführen. Beide Antigene besitzen keinen transmembranen Anteil, sondern sind durch einen GPI-Anker mit der Zellmembran assoziiert. GPI-geankerte Moleküle sind stark angereichert in den sog. Rafts in der Zellmembran (Varma und Mayor, 1998; Friedrichson und Kurzchalia, 1998). Bisher ist nicht geklärt, ob dies auch für CD24 gilt. Die Rafts beinhalten nicht ausschließlich GPI-geankerte Moleküle. Von einigen transmembranen Molekülen ist eine Lokalisation in den Rafts beschrieben (Friedrichson und Kurzchalia, 1998). Möglicherweise könnte eine Kolokalisation von CD24 und LFA-1 auf der Zelloberfläche verantwortlich sein für den beobachteten Effekt. Um dies herauszufinden, wurden von Thymozyten verschiedene Zellfraktionen isoliert: die Membranfraktion, die zytosolische Fraktion und die Rafts, welche aufgrund ihrer Unlöslichkeit in nicht ionischen Detergenzien wie Triton X-100 als sog. DIG-Fraktion isoliert werden können. Die Fraktionen wurden dann organisch gefällt, nach einer Proteinbestimmung äquivalente Proteinmengen im SDS-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Zur Analyse wurden Antikörper gegen CD24 und die β_2 -Kette des LFA-1 Integrins verwendet. In Ermangelung von Western Blot-fähigen Antikörpern konnte leider keine Analyse bezüglich der α_L -Kette des Integrins durchgeführt werden, allerdings bilden beide Ketten das funktionelle Dimer LFA-1 auf der Zelloberfläche. Deshalb kann man davon ausgehen, daß die α_L -Kette in der Zellmembran mit der β_2 -Kette assoziiert. Die Analyse wurde mit Thymozyten aus CD24^{+/+} und mit CD24^{-/-} Mäusen durchgeführt. Abb. 15 zeigt das Ergebnis: CD24 ist in Zellen von CD24^{+/+} Mäusen fast ausschließlich in der DIG-Fraktion zu finden, nicht aber in den CD24^{-/-} Mäusen. Erstaunlicherweise gilt das gleiche für die β_2 -Kette von LFA-1, auch hier findet sich ein großer Anteil des Moleküls in der Detergens-unlöslichen Fraktion. Biochemisch konnte also eine Kolokalisation der beiden Moleküle nachgewiesen werden.

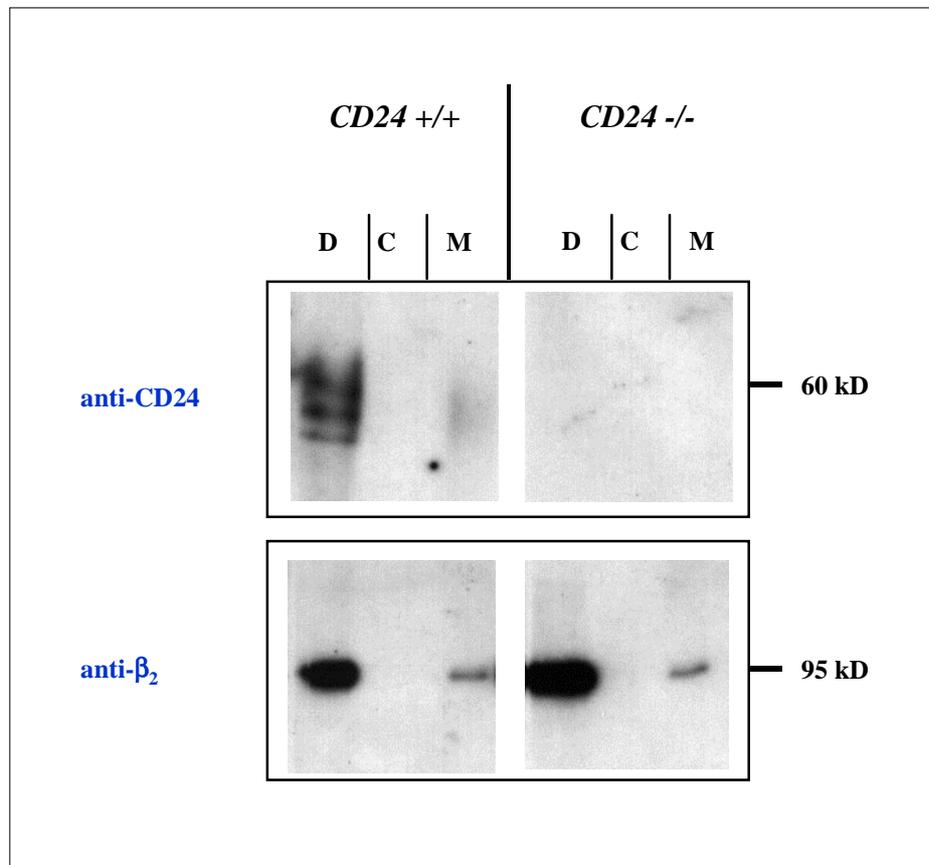


Abb. 15 Western Blot Analyse mit mAk M1.69 gegen CD24 und mAk Tib218 gegen die β_2 -Kette von LFA-1. Analysiert wurden die DIG-Fraktion (D), die zytosolische Fraktion (C) und die Membranfraktion (M) aus CD24^{+/+} und CD24^{-/-} Thymozyten.

Eine fluoreszenzmikroskopische Analyse mittels Laser-Scanning-Mikroskop sollte die Situation direkt auf der Oberfläche darstellen. Hierzu wurden die CD24^{+/+} Thymozyten mit einem PE-konjugierten Antikörper gegen CD24 (mAk M1.69) und mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen die α_L -Kette von LFA-1 (mAk FD18.5) gefärbt. Die beiden Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Die Analyse am Laser-Scanning-Mikroskop wurde von Dr. Herbert Spring, von der Abteilung für Biomedizinische Strukturforschung am DKFZ, durchgeführt. Wie Abb. 16 zeigt, ist eine komplette Kolo-kalisation von CD24 und der α_L -Kette auf der Zelloberfläche, welche sich in der vollständigen Überlagerung der beiden Fluoreszenzfärbungen in einer gelben Fluoreszenz widerspiegeln würde, nicht zu sehen. Legt man allerdings eine Profilanalyse (Abb. 16) über das Fluoreszenzspektrum der Zelle, wird deutlich, daß an vielen Stellen auf der Zelle die Rot-Fluoreszenz resultierend aus der PE-Färbung von CD24 dann zunimmt, wenn auch die Grün-Fluoreszenz resultierend aus der FITC-Färbung der α_L -Kette von LFA-1, ansteigt.

Zusammengenommen mit dem Ergebnis der biochemischen Analyse konnte von einer Kolokalisation des LFA-1 Integrins mit CD24 auf der Zelloberfläche von Thymozyten ausgegangen werden.

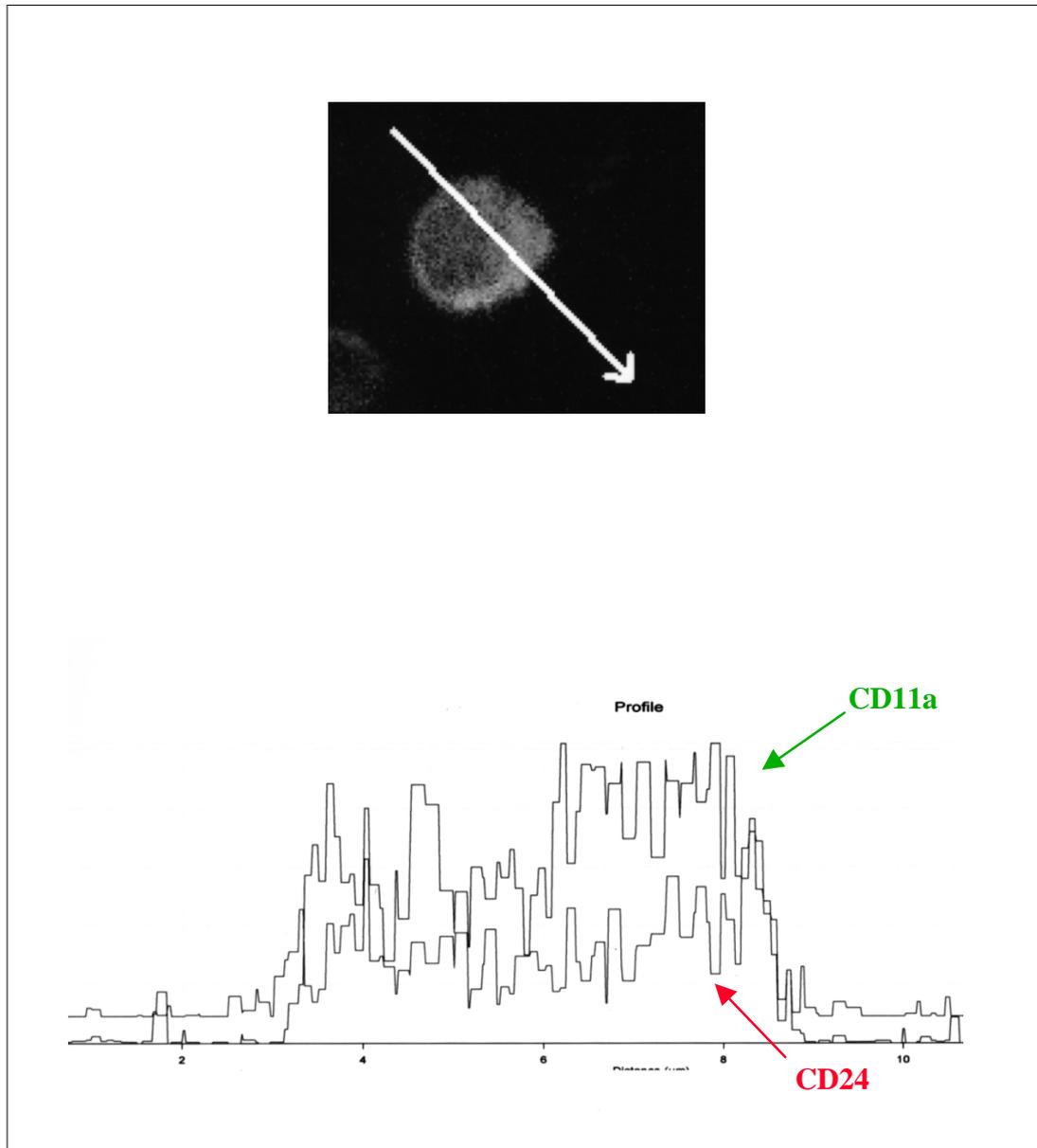


Abb. 16 Fluoreszenzmikroskopische Analyse im Laser-Scanning-Mikroskop. CD24^{+/+} Thymozyten gefärbt mit einem PE-konjugierten Antikörper gegen CD24 (mAk M1.69-PE) und mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen die α_L -Kette (CD11a) von LFA-1 (mAk FD18.5-FITC). Der Pfeil zeigt die Richtung der in der Abbildung dargestellten Profilanalyse der Fluoreszenzverteilung auf der Zelloberfläche an. Im Histogramm stellt sich die PE-Fluoreszenz in rot und die FITC-Fluoreszenz in grün dar.

1.5 Raft-Vernetzung induziert die Bindung über LFA-1

Es wurde bisher gezeigt, daß CD24 und die beiden Integrinketten von LFA-1 in den Rafts auf der Zelloberfläche kolokalisieren. Mit Antikörpern gegen CD24 konnte die LFA-1-abhängige Bindung von Thymozyten an immobilisiertes ICAM-1 induziert werden. Ausgehend von dieser Beobachtung lag die Vermutung nahe, daß über die Zugabe von CD24-Antikörpern eine Vernetzung von CD24 auf der Zelloberfläche induziert wurde. Dies konnte durch die bivalente Natur der IgGs verursacht sein. Wäre dies der Fall, so würde bedingt durch die Lokalisation nicht nur CD24 vernetzt, sondern auch die Rafts geclustert und mit ihnen das LFA-1. Dies würde zu einer lokalen Konzentrationserhöhung des Integrins führen und damit zu einer erhöhten Avidität gegenüber dem Substrat. Ausgehend von dieser Hypothese wurde ein anderes Raft-Molekül, das G_{M1} verwendet. G_{M1} ist ein Gangliosid und ist in den Rafts hoch angereichert. Es wird als Raft-Marker bezeichnet. Cholera Toxin (CTx) bindet spezifisch an G_{M1} . CTx ist ein hexameres Molekül, das aus einer A- und fünf B-Untereinheiten besteht. Die Bindung an G_{M1} erfolgt über je eine der B-Untereinheiten. Die A-Untereinheit führt zu Initiierung eines G-Protein-abhängigen Signalweges in der Zelle (Montecucco et al, 1994). Aufgrund seiner Struktur ist CTx bezüglich des Bindungsvermögens an G_{M1} pentivalent und eignet sich damit vorzüglich, um eine Vernetzung von Rafts auf der Zelloberfläche herbeizuführen. Zwei Formen von CTx sind verfügbar, das Gesamtmolekül und die B-Untereinheit alleine. Beide Formen wurden für Bindungsstudien mit Thymozyten eingesetzt. Wiederum wurde die Bindung an das LFA-1-Substrat ICAM-1 untersucht. Es wurden CD24 $+/+$ und CD24 $-/-$ Thymozyten parallel getestet.

Die Zellen wurden für 5 Min mit den angegebenen Konzentrationen der Agenzien (Abb. 17) vorinkubiert und diese während der Bindung an gereinigtes ICAM-1 darauf belassen. Wie Abb. 17 zeigt, ließ sich durch das CTx-Gesamtmolekül bei beiden Zellarten die Bindung an ICAM-1 erhöhen. Diese Bindungserhöhung verlief dosisabhängig. Mit der B-Untereinheit, die keine Vernetzung zu induzieren vermag, konnte keine Erhöhung der Bindung bei beiden Zellarten beobachtet werden.

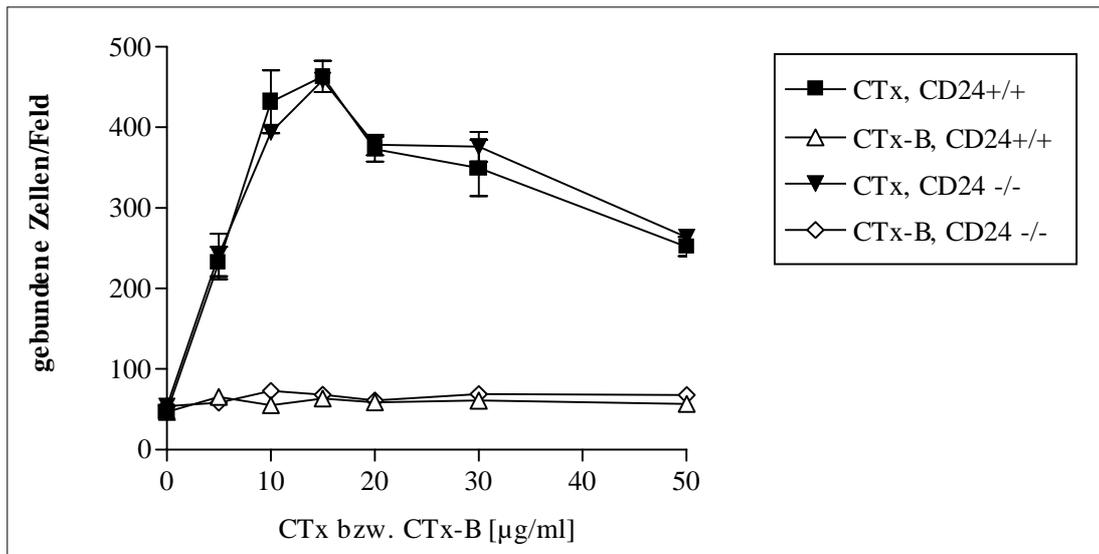


Abb. 17 Bindung von CD24^{+/+} und CD24^{-/-} Thymozyten an immobilisiertes ICAM-1. Zur Aktivierung wurden die Zellen mit verschiedene Konzentrationen CTx bzw. CTx-B-Untereinheit für 5 Min bei RT vorinkubiert und die Agenzien während der 30minütigen Bindung bei RT auf den Zellen belassen.

Wie oben erwähnt, kann die A-Untereinheit zur Initialisierung eines Protein G-abhängigen Signalweges in der Zelle führen. G-Protein-abhängige Signalwege können auch zu einer Erhöhung der Integrinaktivität führen (Montecucco et al, 1994). Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die B-Untereinheit durch einen spezifischen Antikörper (polyklonales Anti-CTx-Serum) vernetzt wurde. Dabei wurden CD24^{+/+} Thymozyten mit 15 µg/ml CTx bzw. CTx-B-Untereinheit oder CTx-B-Untereinheit plus vernetzendem Antikörper für 5 Min vorinkubiert und mit den zugegebenen Agenzien für 30 Min an gereinigtes ICAM-1 binden lassen. Abb. 18 zeigt, daß die B-Untereinheit alleine nicht zu einer erhöhten Bindung von CD24^{+/+} Thymozyten an ICAM-1 führte, eine Vernetzung der Untereinheit mit dem spezifischen Antikörper allerdings die Bindung auf ein Niveau erhöhte, welches dem durch das Gesamt-CTx entspricht. Der mit dem Gesamt-CTx beobachtete Effekt war also unabhängig von der A-Untereinheit.

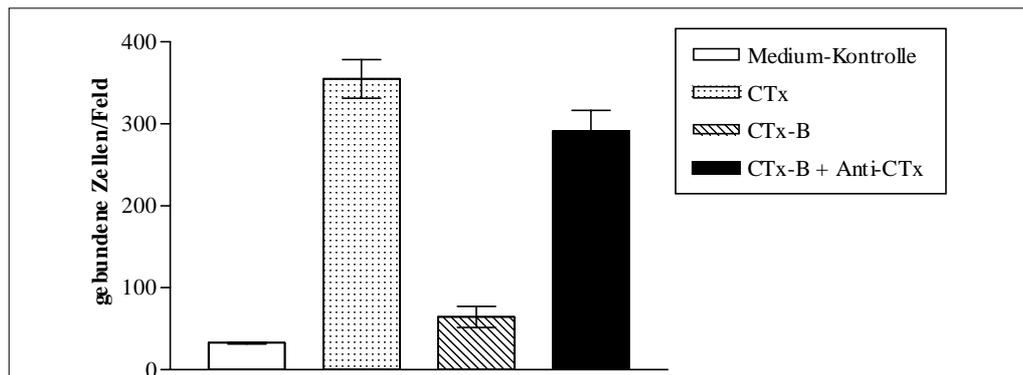


Abb. 18 Bindung von CD24^{+/+} Thymozyten an ICAM-1; gezeigt sind die Mediumkontrolle, die Aktivierung mit CTx (15µg/ml), die Aktivierung mit der CTx-B-Untereinheit (15µg/ml), die Aktivierung mit der CTx-B-Untereinheit (15µg/ml) plus einen Anti-CTx-Antikörper. Die Zellen wurden für 5 Min bei RT mit den Agenzien vorinkubiert und für 30 Min bei RT binden lassen.

1.6 CTx induziert das Clustern von LFA-1 auf der Zelloberfläche

Um das Clustern von LFA-1 auf der Zelloberfläche sichtbar zu machen, wurden CD24^{+/+} Thymozyten mit Anti-LFA-1 Antikörpern, die mit FITC konjugiert waren, angefärbt. Die Analyse der Zellen erfolgte mittels Laser-Scanning-Mikroskop. Untersucht wurden ruhende Thymozyten und Zellen, die für 5 Min mit CTx vorbehandelt waren. In beiden Fällen wurden die Zellen vor der Färbung durch frische Formaldehydlösung fixiert, um einen Effekt der färbenden Antikörper auszuschließen. Abb. 19 zeigt die Färbung der Zellen mit mAk FD18.5 gegen die α_L -Kette von LFA-1. LFA-1 war auf ruhenden Zellen nicht gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Das Integrin lag eindeutig in Clustern vor. Bei den CTx-behandelten Zellen waren die Cluster eindeutig größer und erscheinen stärker kondensiert. Die Färbung mit dem β_2 -Ketten-spezifischen Antikörper mAk Tib213 zeigt gleiche Ergebnisse und wird hier nicht dargestellt.

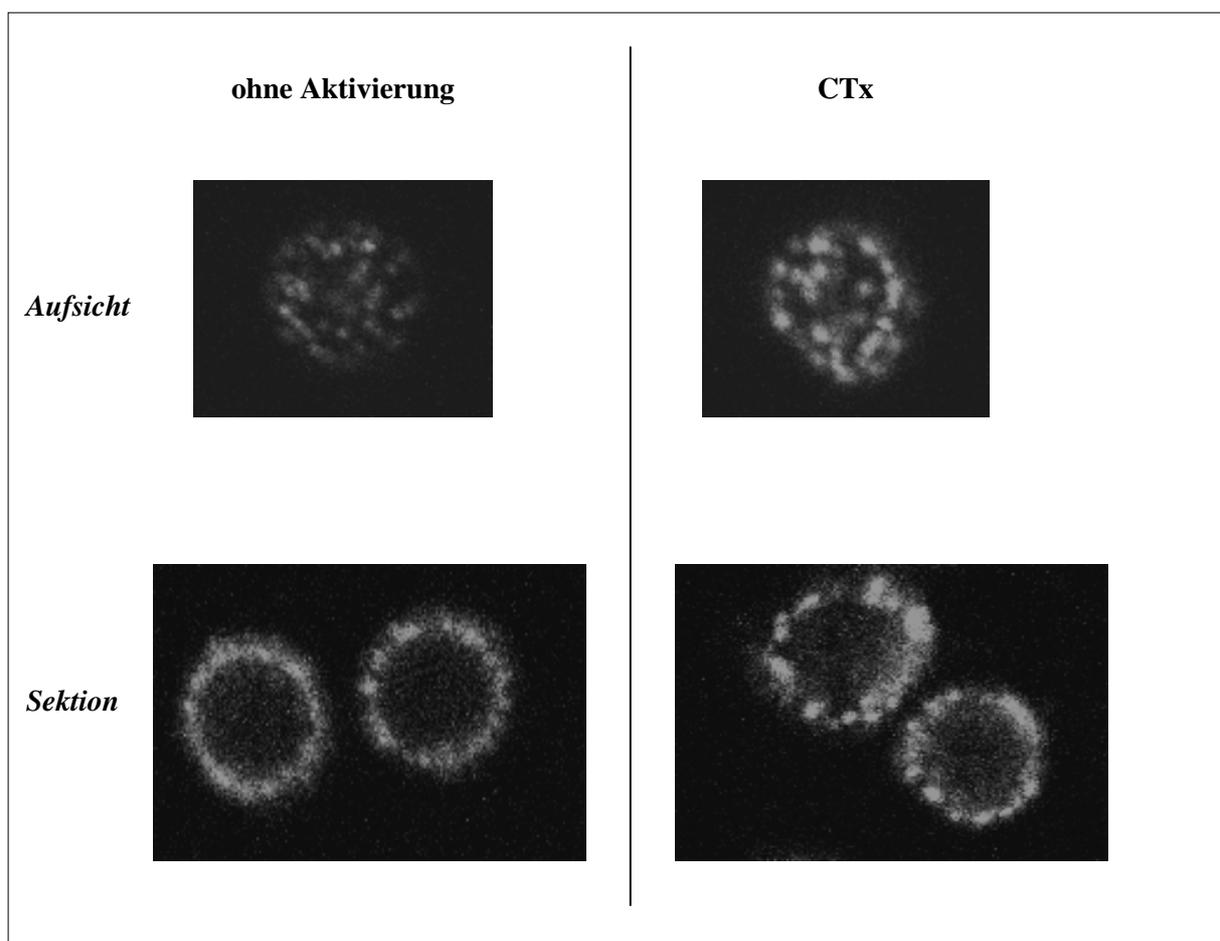


Abb. 19 CD24^{+/+} Thymozyten gefärbt mit einem FITC-konjugiertem Antikörper gegen die α_L -Kette von LFA-1 (mAk FD18.5-FITC). Links sind ruhende Zellen zu sehen, rechts die Zellen nach Aktivierung mit CTx. Die obere Reihe zeigt Aufsichten auf die Zellen, unten sind Querschnitte durch die Zellen zu sehen.

1.7 Die Aktivierung von LFA-1 über Raft-Clustering unterscheidet sich von der PMA-induzierten Aktivierung

Es wurde im vorhergehenden Abschnitt gezeigt, daß es neben den „klassischen“ Wegen, Integrine zu aktivieren, noch einen anderen Weg gibt, nämlich den über Raft-Vernetzung. Mit klassischen Wegen sind hier die in der Literatur beschriebene Aktivierung von LFA-1 durch Mg^{2+} /EGTA (Stewart et al, 1998) und die Aktivierung von Integrinen durch Stimulation der Proteinkinase C (PKC) (Rothlein und Springer, 1986; Stewart et al, 1996; Kolanus und Seed, 1997) gemeint. Die PKC kann extern durch die Gabe von Phorbolestern wie PMA aktiviert werden (Stewart et al, 1996).

Nachdem nun dargelegt werden konnte, daß Raft-Vernetzung LFA-1 vermittelte Bindung induzieren kann, sollte dieser Aktivierungsweg näher charakterisiert werden. Vorausgehende Studien haben gezeigt, daß *src*-Kinasen in den Rafts stark angereichert sind (Cinek und Horejsi, 1992; Harder und Simons, 1999). Des weiteren ist aus eigenen Arbeiten bekannt, daß CD24 in ESb-MP-Zellen mit den *src*-Kinasen *hck*, *lck* und *lyn* assoziiert. In diesen Zellen führen Antikörper gegen CD24 zu einer Tyrosin-Phosphorylierung von *lck* und *lyn* (Sammar et al., 1997). Es ist also anzunehmen, daß die Antikörper gegen CD24 in den Thymozyten nicht nur „Inseln“ auf der Zelloberfläche bewegen, sondern Signalkaskaden initiieren.

Um eine Beteiligung der o. g. *src*-Kinasen, die zur Großfamilie der Tyrosin-Kinase gehören, im Signalweg zu untersuchen, wurden Bindungsversuche mit CD24^{+/+} Thymozyten auf ICAM-1 durchgeführt, bei denen die Zellen mit spezifischen Inhibitoren vorinkubiert wurden. Es wurden jeweils vier verschiedene Arten der Aktivierung von Integrinen gewählt: die Aktivierung durch Mg²⁺/EGTA, die beiden Wege der Raft-Vernetzung (Anti-CD24 und CTx) und ein Phorbol ester-induzierter Weg. Abb. 20 faßt eine Reihe von Inhibitionsexperimenten zusammen. Die Anzahl der gebundenen Zellen ist dargestellt in %, verglichen mit der Bindung in Abwesenheit des jeweiligen Inhibitors. Genistein, ein Inhibitor für Tyrosin-Kinasen, inhibierte die durch Raft-Vernetzung induzierte Bindung an ICAM-1 um 60 bis 70 %, verglichen mit der Aktivierung ohne Vorinkubation mit Inhibitor. Der gleiche Inhibitor zeigte allerdings keinen Effekt auf die Bindung nach Aktivierung mit Mg²⁺/EGTA oder PMA. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich nach Vorinkubation der Zellen mit Wortmannin, welches die PI3-Kinase inhibiert. Im Gegensatz dazu blockierte der PKC-spezifische Inhibitor Bisindolylmaleimide I nur die Bindung der durch PMA aktivierten Zellen. Dies steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß die PMA verursachten Effekte über die PKC verlaufen (Kolanus und Seed, 1997). Es läßt sich festhalten, daß die durch Raft-Vernetzung induzierte Erhöhung der LFA-1-Aktivität sich deutlich von der Aktivierung mit Phorbol estern oder Kationen unterscheidet.

Eine Änderung der Integrinaktivität, die durch eine Änderung der Avidität bedingt wird, setzt Clustering und damit Zytoskelett-Veränderungen voraus (Stewart et al, 1998; van Kooyk et al, 1999). Um die Rolle des Zytoskeletts beim Raft-Clustern zu untersuchen, wurden Thymozyten vor dem Bindungsversuch mit Jasplakinolide inkubiert. Jasplakinolide stabilisiert vorhandene Actinfilamente, unterstützt die Actin-Polymerisation und unterbindet die Depolymerisation, d. h. mit Hilfe dieser Substanz kann der bestehende Zytoskelett-Zustand „eingefroren“ werden. Wie in Abb. 20 zu sehen, beeinflusste die Inkubation der Zellen mit Jasplakinolide nicht die Aktivierbarkeit über Mg²⁺/EGTA, hingegen wurde die

Aktivierbarkeit über Antikörper gegen CD24 und CTx um 85 bzw. 75 % reduziert. Auch die Bindung nach Aktivierung durch den Phorbolster PMA ging auf 37 % zurück. Die letztgenannten Wege bedürfen demnach Zytoskelettveränderungen.

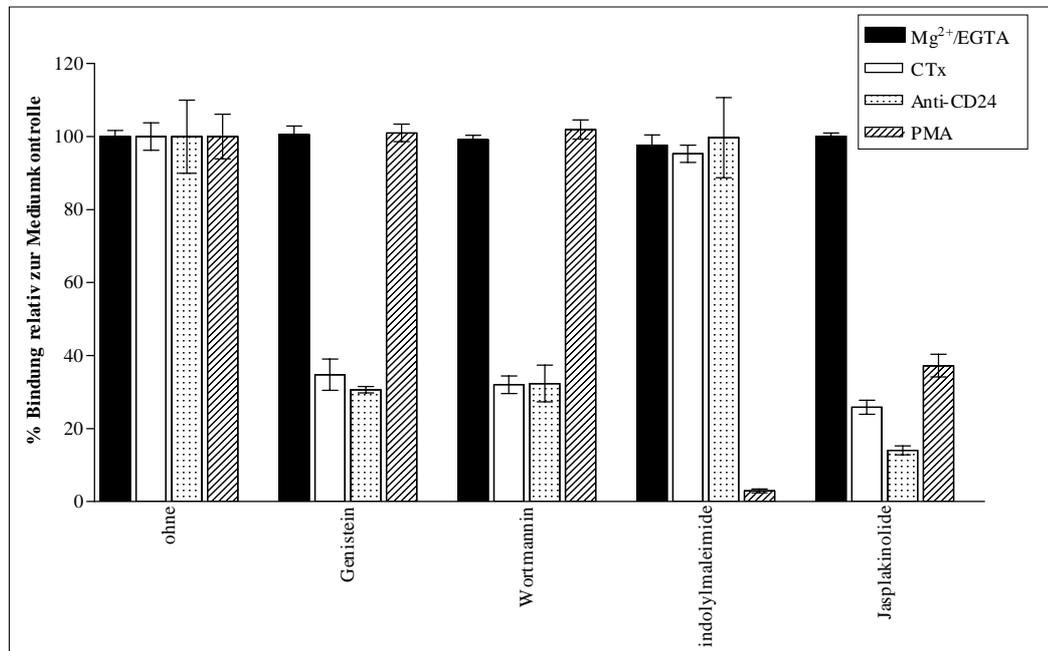


Abb. 20 Bindung von CD24^{+/+} Thymozyten an ICAM-1. Die Bindung der Zellen ohne spezifische Inhibition wurde jeweils als 100 % angesetzt. Die Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren erfolgte genau wie in Material und Methoden beschrieben, anschließend wurde die Bindung an gereinigtes ICAM-1 getestet.

1.8 Raft-Clustering induziert die Tyrosin-Phosphorylierung von pp16/18

Wie oben gezeigt, sind in den Signalweg, der in Thymozyten durch Raft-Vernetzung zur Aktivierung des LFA-1-Integrins führt, Tyrosin-Kinasen involviert. Dieser Aspekt sollte nun näher untersucht werden. Hierzu wurden Thymozyten mit dem CD24 spezifischen Antikörper mAk M1.69 (15 µg/ml), CTx (15 µg/ml), Mg²⁺/EGTA (5 mM/1 mM) oder PMA (50 ng/ml) für die in Abb. 21 angegebenen Zeitdauern aktiviert und anschließend sofort lysiert. Das gesamte Zellysate wurde in einem 12,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt und mit einem Phospho-Tyrosin-spezifischen Western Blot analysiert. Wie in Abb. 21 zu sehen, führte das Clustern der Rafts in Thymozyten zur Tyrosin-Phosphorylierung eines kleinen Proteins in der Größe von 16 bis 18 kDa. Bei den anderen Wegen der Aktivierung war eine solche Phosphorylierung nicht zu sehen. Trotz zahlreicher Versuche ist es bisher nicht gelungen, die Identität dieses kleinen Phosphoproteins, welches pp16/18 getauft wurde, aufzuklären.

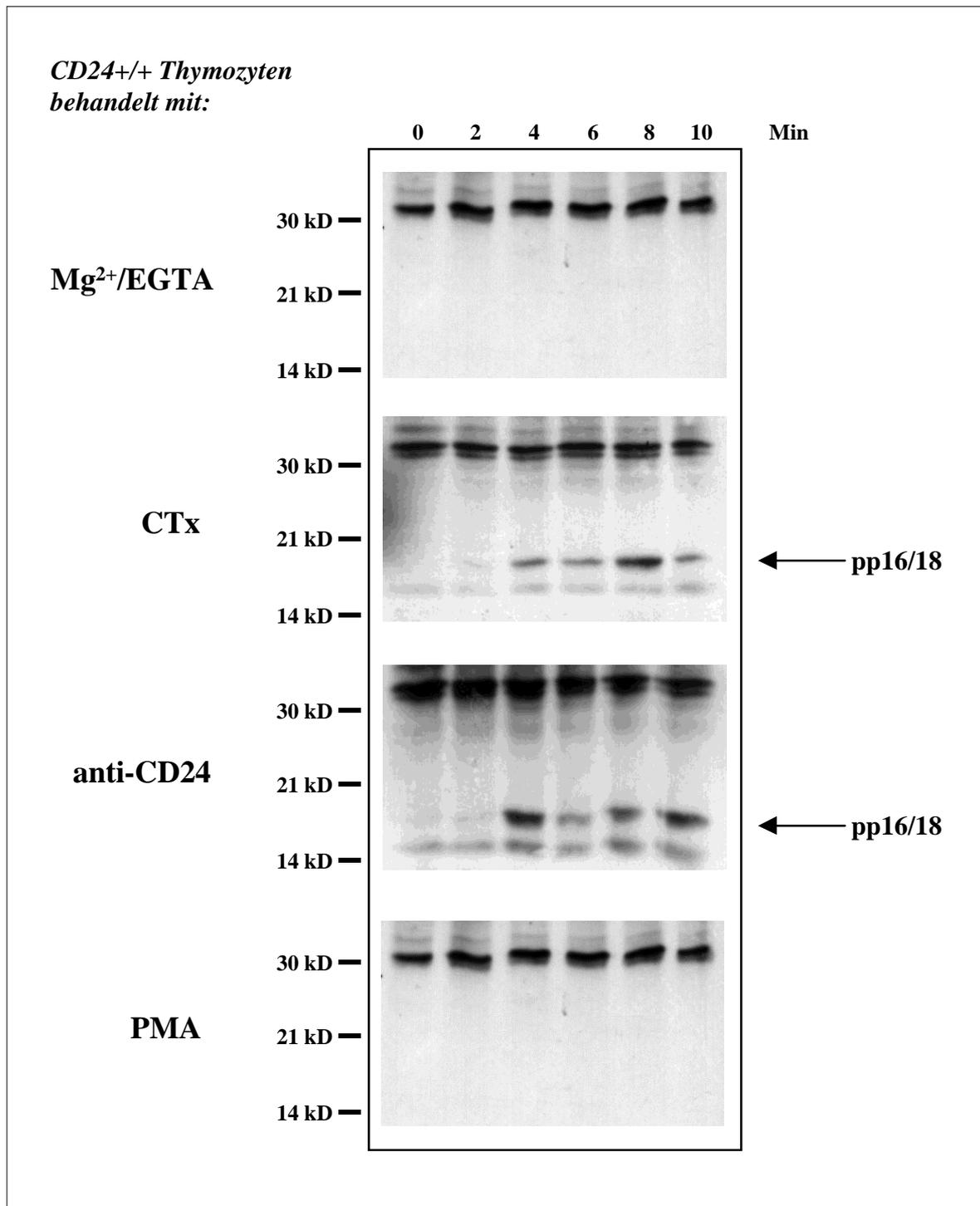


Abb. 21 Western Blot Analyse von CD24^{+/+} Thymozyten-Gesamtlysat nach Aktivierung durch Mg²⁺/EGTA, CTx, Antikörper gegen CD24 (mAk M1.69) oder PMA für verschiedene Zeitpunkte. Die Western Blot Analyse wurde mit dem pTyrosin-spezifischen Antikörper mAk 4G10 durchgeführt.

Neben zahlreichen Versuchen, das Protein präparativ aufzureinigen, um genügend Material zur Sequenzierung zu erhalten, wurden verschiedene Zelllinien auf die Expression von

pp16/18 untersucht. Hierzu wurden die T-Zell-Hybridome 1H3, CrP 27.4, CrP 56.1, die T-Zell-Lymphome EL-4 und TK1 und die monozytären Zelllinien ESb 289, ESb-L und ESb-MP verwendet. Die Zellen wurden ohne Aktivierung bzw. nach Aktivierung mit CTx direkt lysiert und eine Western-Blot-Analyse mit einem Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper durchgeführt. Abb. 22 zeigt das Ergebnis dieser Analyse. Die T-Zell-Hybridome exprimierten konstitutiv das Tyrosin-phosphorylierte pp16/18, genau wie das T-Zell-Lymphom EL-4. Bei dem T-Zell-Lymphom TK1 und der monozytären Linie ESb 289 wurde pp16/18 erst nach Aktivierung der Zellen mit CTx deutlich sichtbar. Die Zelllinien ESb-L und ESb-MP wiesen pp16/18 im Phospho-Tyrosin-spezifischen Western Blot nicht auf.

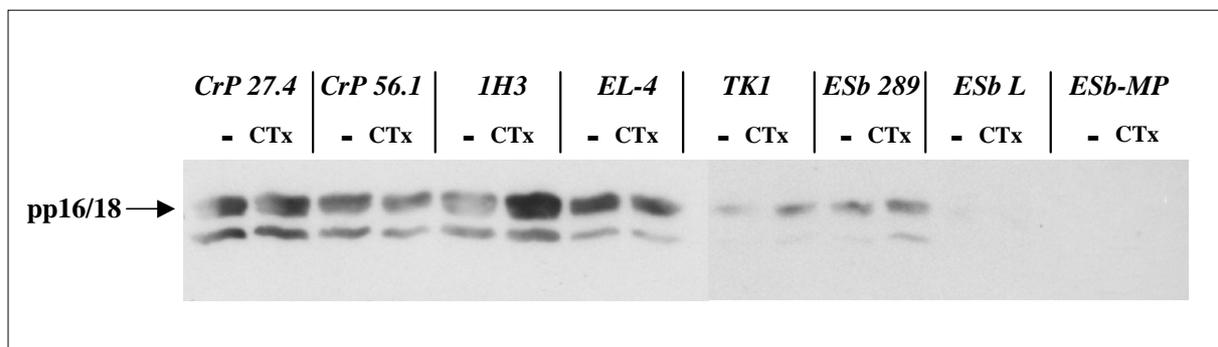


Abb. 22 Western Blot Analyse mit dem pTyrosin-spezifischen Antikörper mAk 4G10. Gezeigt sind verschiedene Zelllinien ohne und nach Aktivierung mit 15 µg/ml CTx für 5 Min bei 37 °C.

1.9 Cholesterin-Depletion verhindert die Aktivierung von LFA-1 durch Raft-Clustern

Bisher konnte gezeigt werden, daß Antikörper gegen CD24 in Thymozyten die Aktivierung von LFA-1 verursachen können. Es hatte sich gezeigt, daß dieser Effekt im Zusammenhang steht mit dem Clustern der Membranrafts auf der Zelloberfläche. Die Integrität von Rafts ist stark von der Anwesenheit von Cholesterin abhängig. Es ist bekannt, daß die Depletion von zellulärem Cholesterin die Rafts zerstören und ihre Funktionalität unterbinden kann (Xavier et al, 1998). Die nun folgenden Experimente zeigen die Auswirkung von Cholesterin-Depletion auf die Aktivierbarkeit der LFA-1 vermittelten Bindung. Cholesterin wurde mittels Methyl-β-Cyclodextrin (MCD) aus den Thymozyten extrahiert. Dazu wurden die Zellen für 15 Min mit 1mM MCD bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für Bindungsversuche verwendet. Auch hier wurde wieder der Effekt der Depletion auf die verschiedenen Arten der

Aktivierung untersucht. Abb. 23 stellt die Ergebnisse mit Thymozyten dar: Nach Depletion des Cholesterins war die Aktivierbarkeit über CD24-Antikörper bzw. CTx stark verringert. Auch der PMA-induzierte Weg erschien reduziert, allerdings nicht so stark. Die Regulation der Integrinaktivität über Kationen blieb uneingeschränkt bestehen.

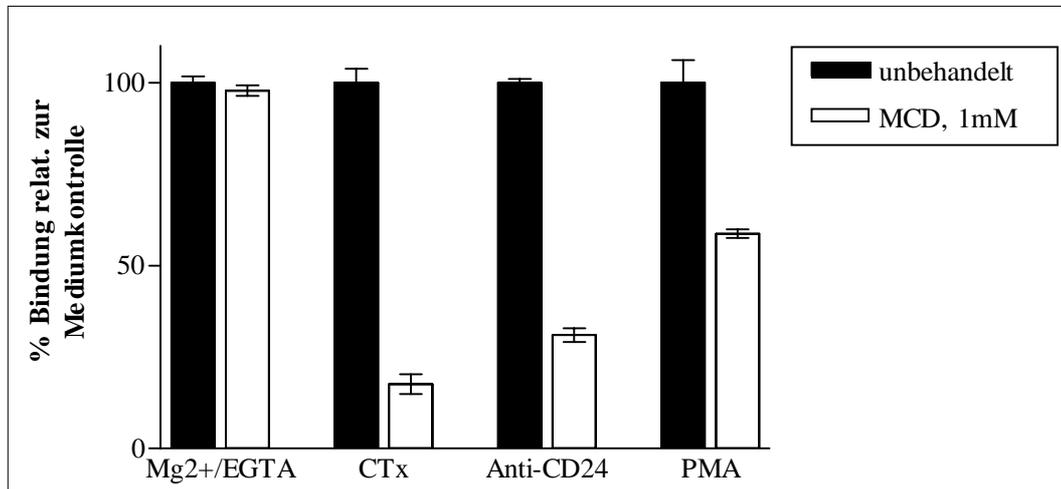


Abb. 23 Bindung von CD24^{+/+} Thymozyten an ICAM-1. Die Zellen wurden für 5 Min bei RT durch 5 mM/1 mM Mg²⁺/EGTA, 15 µg/ml CTx, 15 µg/ml Antikörper gegen CD24 (mAk M1.69) oder 50 ng/ml PMA aktiviert. Die schwarzen Balken zeigen die unbehandelten Zellen, die weißen Balken die Zellen nach Behandlung mit 1 mM MCD.

Die gleichen Untersuchungen wurden mit aktivierten T-Zellen durchgeführt. T-Zell-Blasten nach 2 Tagen Aktivierung durch ConA zeigten basal eine sehr viel stärkere Bindung an ICAM-1 (siehe Abb. 25), die aber nach Gabe der verschiedenen Aktivatoren noch um ca. 20 % verstärkt werden konnte. Nach Behandlung mit MCD, welches hier allerdings in einer höheren Konzentration eingesetzt wurde, zeigten sich in den Zellen ein ähnlicher Effekt wie in Thymozyten (Abb. 24). Die Bindung ließ sich durch die Raft-Vernetzer sehr viel schlechter aktivieren, auch die PMA-Induktion war beeinträchtigt. Die Regulierbarkeit durch Mg²⁺/EGTA blieb auch hier voll erhalten.

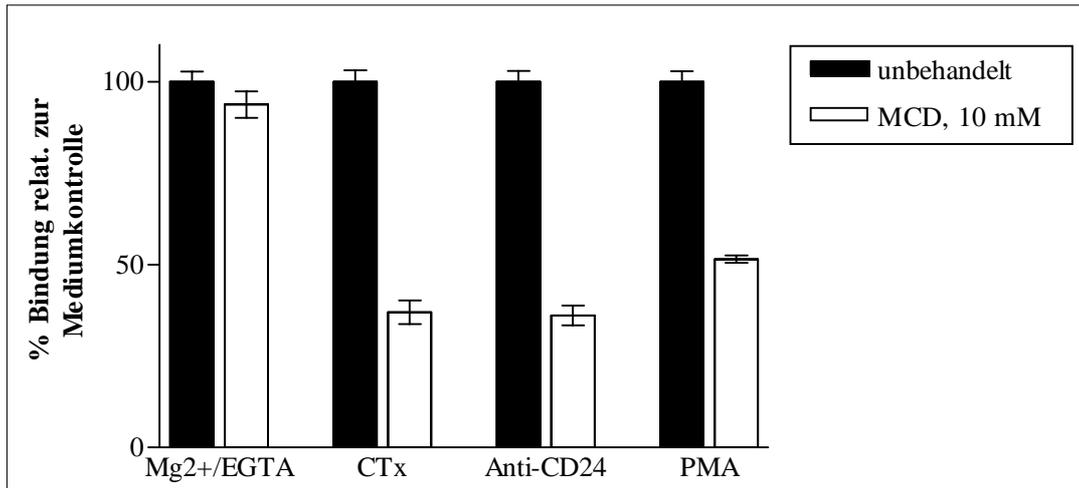


Abb. 24 Bindung von CD24^{+/+} T-Zell-Blasten an ICAM-1. Die Zellen wurden aktiviert durch 5 mM/1 mM Mg²⁺/EGTA, 15 µg/ml CTx, 15 µg/ml Antikörper gegen CD24 (mAk M1.69) oder 50 ng/ml PMA. Die schwarzen Balken zeigen die unbehandelten Zellen, die weißen Balken die Zellen nach Behandlung mit 10 mM MCD.

1.10 Raft-Integrität ist Voraussetzung für die basale Bindungsfähigkeit von aktivierten T-Zellen

Wie oben erwähnt, zeigten aktivierte T-Zellen ein sehr viel höheres basales Bindungsvermögen als Thymozyten. Bedingt durch den Aktivierungszustand der Zellen sind hier die Integrine und somit auch das LFA-1 aktiv. Dies spiegelte sich in einer relativ hohen Bindung der Zellen an ICAM-1 im Bindungsversuch wider (Abb. 25). Durch Depletion des Cholesterins mit MCD konnte die basale Bindung in dosisabhängiger Weise unterbunden werden. In den Cholesterin-depletierten Zellen blieb die Funktionalität des Integrins aber erhalten, wie die Aktivierbarkeit mit Mg²⁺/EGTA zeigte.

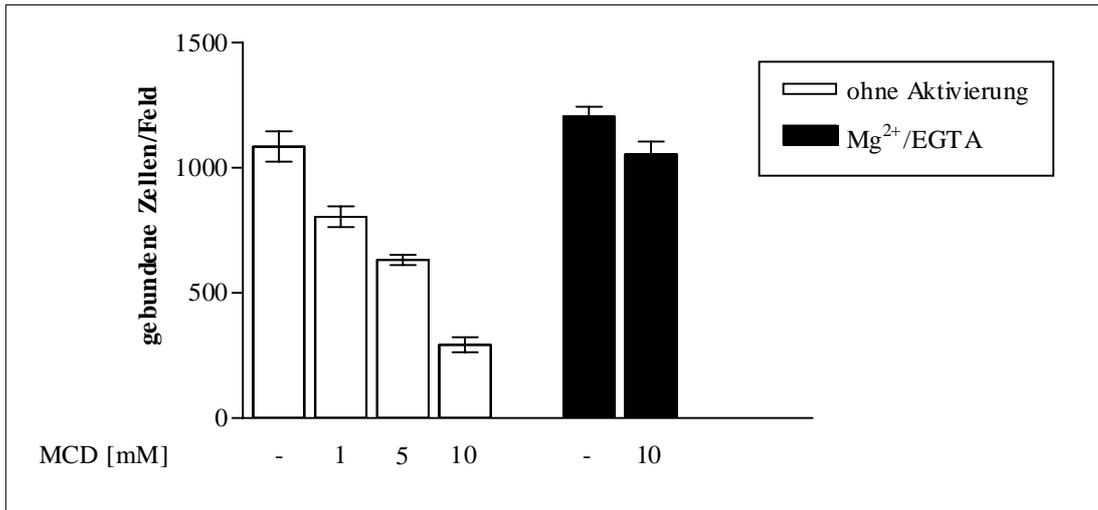


Abb. 25 Bindung von CD24^{+/+} T-Zell-Blasten an ICAM-1. Die weißen Balken zeigen die Zellen ohne Aktivierung, die schwarzen Balken nach Aktivierung mit Mg²⁺/EGTA. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen MCD behandelt.

Ein weiterer Weg, das Cholesterin aus den Zellen zu entfernen, ist die Inhibition der Neusynthese. Dazu wurden die Zellen für 20 h mit dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Lovastatin in einer Konzentration von 1 μ M im CO₂-Inkubator bei 37 °C inkubiert. Wie Abb. 26 zeigt, ließ sich auch durch diese Behandlung die basale Bindung der Zellen um ca. 50 % reduzieren. Die Zellen sind dann auch nicht mehr aktivierbar durch CTx, allerdings voll aktivierbar durch Mg²⁺/EGTA. Diese Versuche machen die physiologische Rolle der Raft-Integrität in aktivierten T-Zellen deutlich.

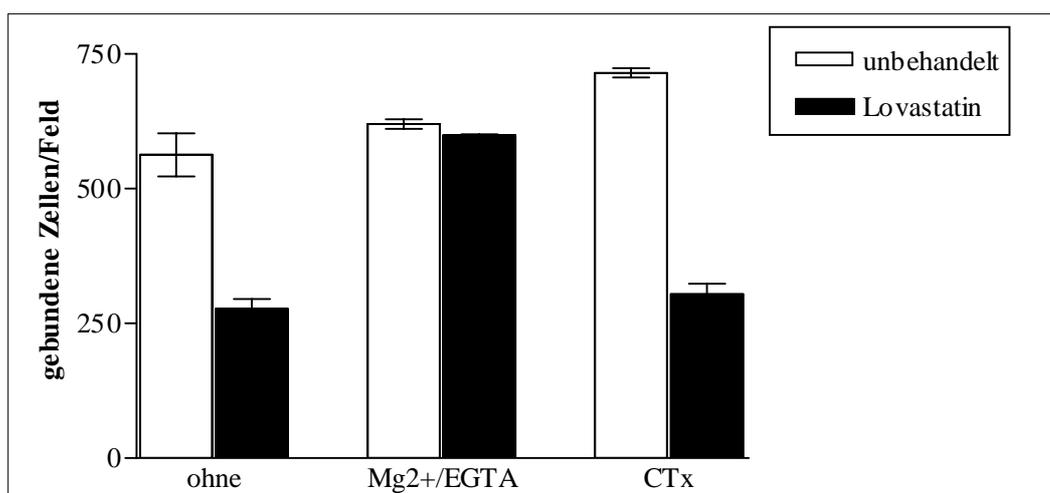


Abb. 26 Bindung von CD24^{+/+} T-Zellen an ICAM-1. Die weißen Balken zeigen die Bindung der unbehandelten Zellen, die schwarzen Balken die Bindung der Lovastatin-behandelten Zellen. Die Zellen wurden entweder nicht oder durch 5 mM/1mM Mg²⁺/EGTA oder 15 μ g/ml CTx aktiviert.

2. Die Funktion des CD24 in Membran-Rafts

Im vorherigen Abschnitt war das CD24 als ein Membranmolekül behandelt worden, mit dessen Hilfe Raft-Clustering über Vernetzung durch einen spezifischen Antikörper analysiert werden konnte. Frühere Daten von Hahne et al (1994) und Kilger et al (1995) zeigen, daß eine von CD24 k.o. Tieren etablierte präB-Zelllinie eine stark verminderte Fähigkeit zur Bindung an Fibronectin aufwies. Re-Expression von CD24 nach Transfektion vermochte diesen Effekt zu restaurieren. Dies bedeutet, daß die alleinige An- oder Abwesenheit von CD24 Einfluß auf das Bindungsvermögen der Zellen über das α_4 -Integrin VLA-4 hat. Dieses System der präB-Zellen sollte nun verwendet werden, um die Rolle von CD24 in den Rafts näher zu beleuchten.

Bei den präB-Zelllinien handelt es sich um die Tumorzelllinie N232.18 und die mit CD24-retransfizierte Linie mit 18H18. Beide Linien und auch die CD24 k.o. Mäuse wurden von Peter Nielsen vom MPI für Immunbiologie in Freiburg zur Verfügung gestellt.

2.1 CD24^{+/+} Zellen binden besser an FN40 als CD24^{-/-} Zellen

Zur Einführung des Systems wurden mit den CD24^{+/+} (18H18) und CD24^{-/-} (N232.18) präB-Zelllinien Bindungsversuche auf dem α_4 -Integrin-Substrat FN40 durchgeführt. Hierzu wurden 8-Loch-Kammern mit FN40 beschichtet und den Zellen ohne zusätzliche Aktivierung für 30 Min bei RT erlaubt zu binden. Die CD24^{+/+} Zellen 18H18 banden deutlich besser an FN40 als die CD24^{-/-} N232.18 (Abb. 27). Unspezifische Bindung wurde an BSA gemessen. Die CD24^{+/+} (18H18) und CD24^{-/-} (N232.18) präB-Zelllinien wurden anschließend im FACS auf die Expression des α_4 -Integrins und von CD24 analysiert.

Abb. 28 zeigt die Färbung der beiden Tumorzelllinien mit mAk 79 gegen CD24 und mAk 5/3 gegen das α_4 -Integrin. Die N232.18-Zellen exprimierten kein CD24, die CD24-transfizierte Linie 18H18 trug CD24 auf der Zelloberfläche. Beide Zelllinien zeigten ein gleich hohes Expressionsniveau für das α_4 -Integrin.

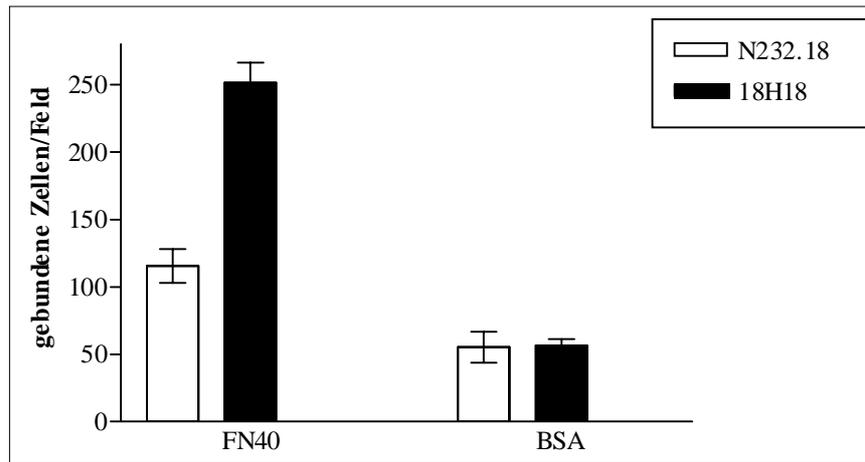


Abb. 27 Basale Bindung der CD24^{-/-} Zellen N232.18 und der CD24^{+/+} Zellen 18H18 an immobilisiertes α_4 -Integrin-Substrat FN40. Die Bindung erfolgte für 30 Min bei RT ohne Aktivierung der Zellen. Unspezifische Bindung wurde an BSA gemessen.

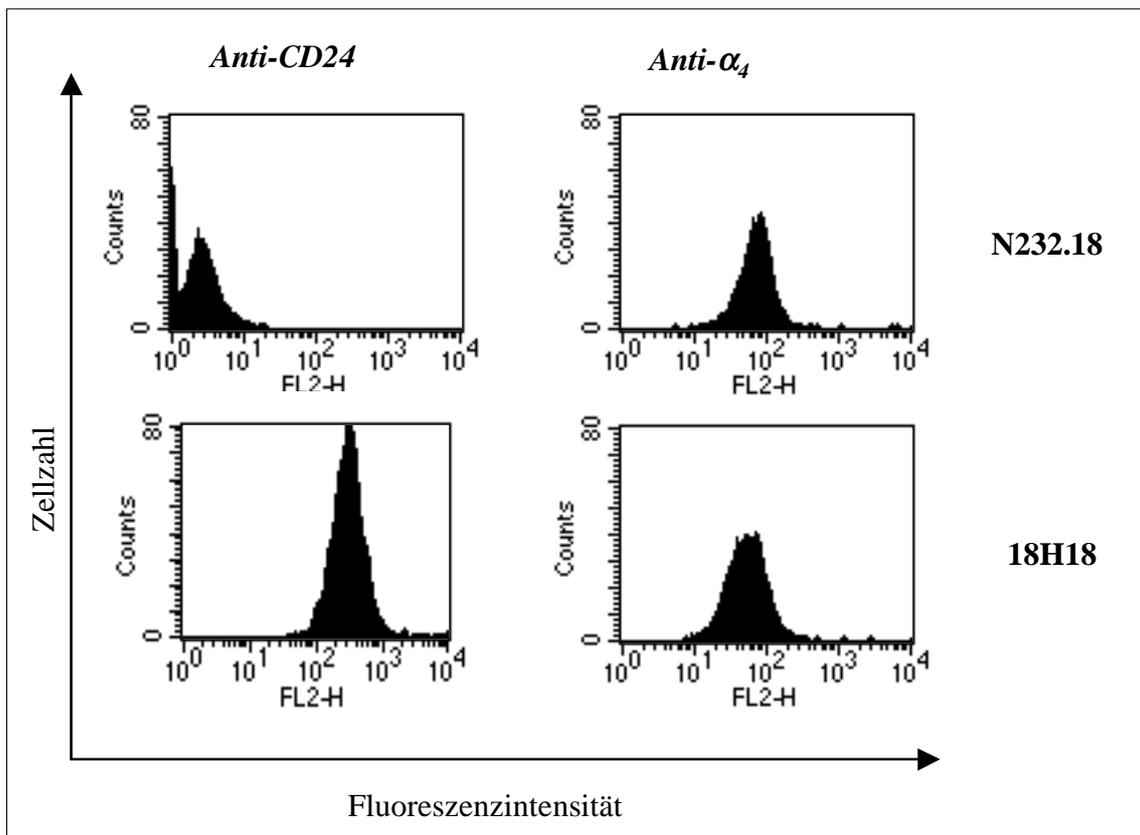


Abb. 28 FACS-Analyse der CD24^{-/-} präB-Zelllinie N232.18 und der CD24^{+/+} präB-Zelllinie 18H18. Die Zellen wurden gefärbt mit mAk 79 gegen CD24 und mit mAk 5/3 gegen das α_4 -Integrin.

2.2 18H18-Revertanten verlieren die Fähigkeit zur Bindung an FN40

Von den CD24-transfizierten Zellen 18H18 ergaben sich Revertanten, die CD24 wieder verloren hatten. Um auszuschließen, daß es sich bei den beobachteten Bindungsunterschieden um eine Eigenschaft des Tumorzellklones N232.18 handelte, wurden mit diesen Revertanten Bindungsversuche auf FN40 durchgeführt. Verglichen wurden die Linie N232.18, die mit CD24 transfizierte Linie 18H18 und Revertanten aus der transfizierten Linie 18H18, die das Antigen wieder verloren hatten. Die Anreicherung der CD24 negativen, bzw. CD24 positiven Zellen erfolgte nach Anfärbung von CD24 mit spezifischem Antikörper und PE-gekoppeltem Zweitantikörper durch den FACS Vantage Zellsorter. Die Bindung wurde verglichen mit der Bindung an das Blockierungsreagenz BSA.

Abb. 29 zeigt die deutlichen Unterschiede in der basalen Bindung der CD24^{-/-} und CD24^{+/+} an das α_4 -Substrat FN40. Der Inlay zeigt die FACS-Analyse der transfizierten 18H18-Zellen, die z. T. CD24 wieder verloren hatten und entsprechend angereichert wurden. Die CD24^{+/+} Zellen banden deutlich besser als die CD24^{-/-}. Daß es sich hierbei nicht um einen Defekt des untransfizierten Klones N232.18 handelte, zeigt das Bindungsverhalten der Revertanten 18H18 CD24^{-/-}.

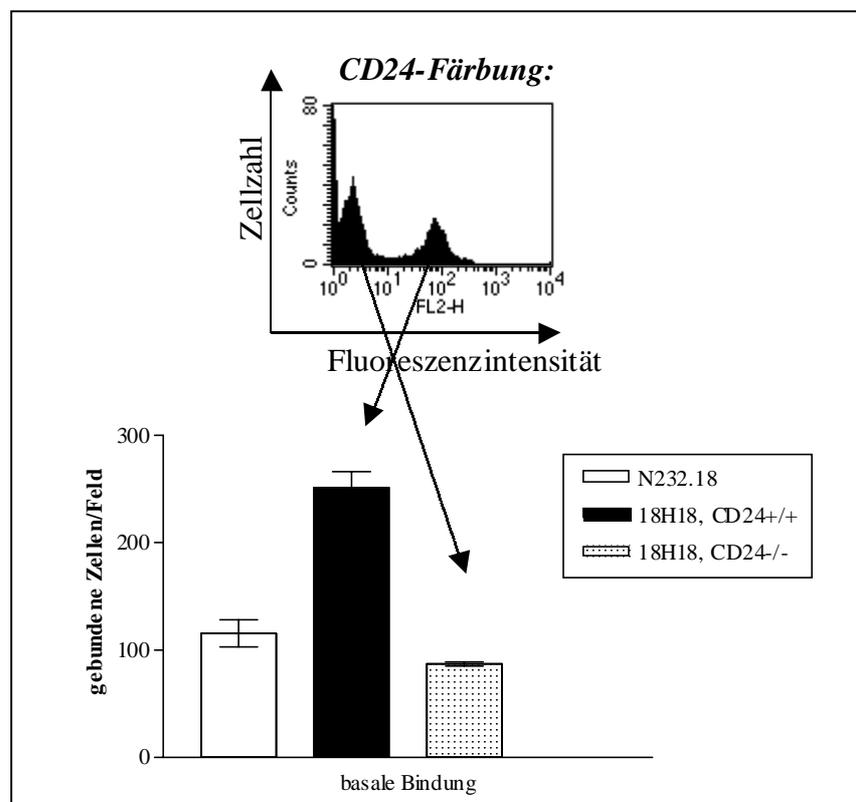


Abb. 29 Basale Bindung von CD24^{-/-} (N232.18 und 18H18, CD24^{-/-}) und CD24^{+/+} präB-Tumorzellen an FN40. Rechts ist unspezifische Bindung an BSA mit aufgezeigt. Das Histogramm zeigt die Zelllinie 18H18 nach Anfärbung durch einen CD24-spezifischen Antikörper.

2.3 Die Bindung der Zellen wird vermittelt durch das α_4 -Integrin

Um nachzuweisen, daß die Bindung der präB-Zellen durch das α_4 -Integrin vermittelt wurde, wurden Inhibitionsexperimente mit den Zelllinien N232.18, 18H18 und die CD24 negative Revertante durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem Antikörper gegen das α_4 -Integrin (mAk 5/3) für 5 Min bei RT vorinkubiert und anschließend den Zellen für 30 Min bei RT an FN40 erlaubt zu binden. Dabei wurde der inhibierende Antikörper auf den Zellen belassen. Abb. 30 zeigt in allen drei Fällen sowohl die relativ geringe Bindung der CD24^{-/-} Zellen als auch die starke Bindung der CD24^{+/+} Zellen durch das α_4 -Integrin vermittelt wurde und durch einen entsprechenden Antikörper (mAk 5/3) inhibiert werden konnte. Die Bindung der CD24^{+/+} Zellen läßt sich dosisabhängig mit dem Antikörper unterbinden. Unspezifische Bindung wurde an BSA getestet und durch die Antikörper nicht beeinflusst.

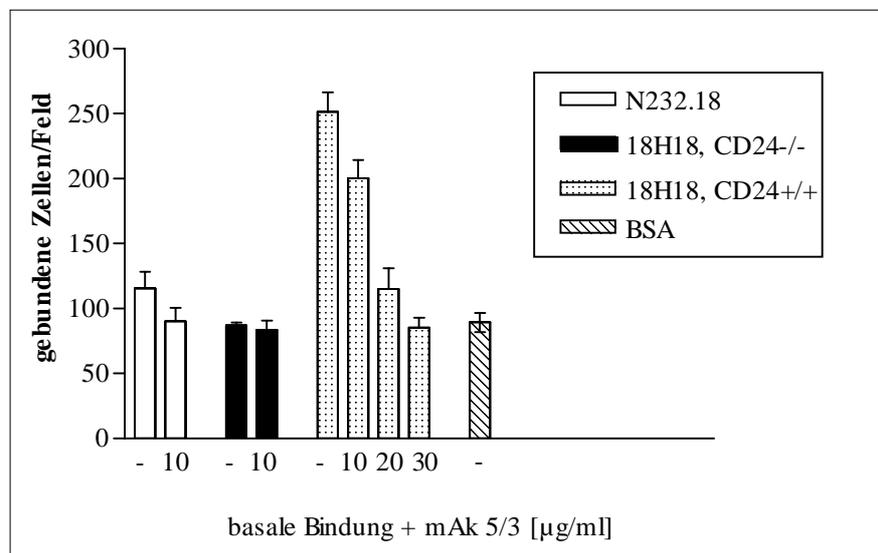


Abb. 30 Bindung von CD24^{-/-} (N232.18 und 18H18, CD24^{-/-}) und CD24^{+/+} präB-Tumorzellen an FN40. Die basale Bindung wird inhibiert durch einen Antikörper gegen das α_4 -Integrin (mAk 5/3).

2.4 PMA restauriert den Bindungsdefekt von CD24^{-/-} Zellen

Als nächstes galt es sicherzustellen, daß das Integrin auf den CD24^{-/-} Zellen keinen Defekt aufwies. Hierzu wurden Bindungsversuche auf FN40 durchgeführt, bei denen die Zellen durch den Phorbolster PMA aktiviert wurden. Verglichen wurden der CD24^{-/-} Klon N232.18, 18H18 und der daraus resultierenden Revertante 18H18 CD24^{-/-}, die das Antigen wieder verloren hatten. Die Zellen wurden mit 50 ng/ml PMA für 5 Min vorinkubiert und der Phorbolster während des gesamten Bindungsversuchs auf den Zellen belassen. Es gelang

mittels des Phorbolesters PMA sowohl die CD24^{-/-} als auch die CD24^{+/+} Zellen auf ein gleiches Bindungsniveau zu bringen (Abb. 31). Das Integrin auf den CD24^{-/-} Zellen war also prinzipiell funktionsfähig, der Unterschied in der α_4 -vermittelten Bindung war abhängig von der An- oder Abwesenheit von CD24.

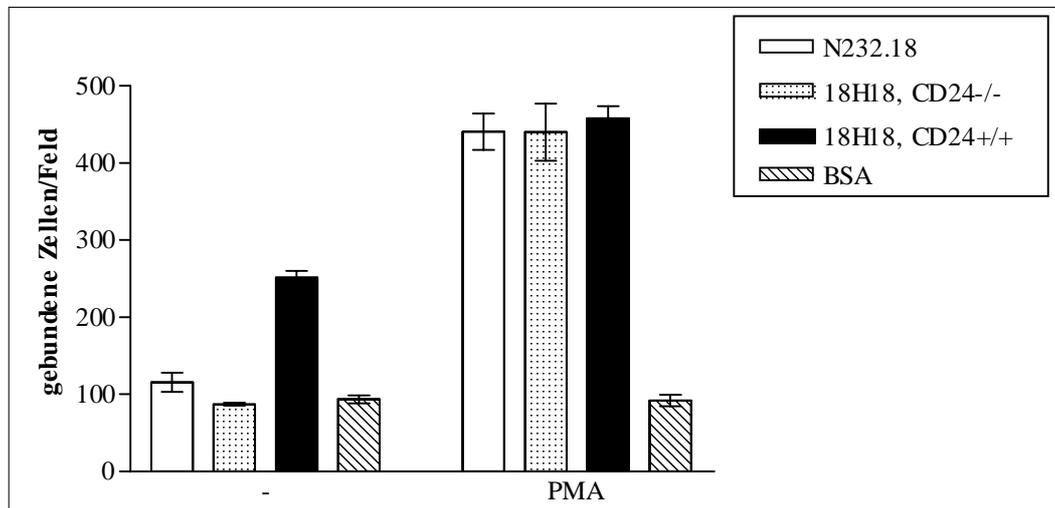


Abb. 31 Bindung von CD24^{-/-} (N232.18 und 18H18, CD24^{-/-}) und CD24^{+/+} präB-Tumorzellen an FN40. Links ist die basale Bindung der Zellen dargestellt, rechts die Bindung nach Aktivierung mit PMA (50 ng/ml). Unspezifische Bindung wurde gemessen an BSA.

2.5 Die Zellen unterscheiden sich auch in der Migration

Wie oben gezeigt, unterscheiden sich die CD24^{-/-} und CD24^{+/+} Zellen in der statischen Adhäsion an FN40. α_4 -Integrine haben auch eine wichtige Funktion für die Migration von B-Lymphozyten auf Fibronectin im Knochenmark (Myake et al, 1991). Die Frage war nun, ob sich die Zellen auch in der Migration unterscheiden. Abb. 32 zeigt das Migrationsverhalten der Zellen. Die Membranen der Migrationskammern wurden mit FN40 beschichtet und die Zellen für 16 h ohne Aktivierung migrieren lassen. Das Ergebnis wird in Prozent der transmigrierten Zellen verglichen mit dem Input angegeben. Dargestellt sind die Ergebnisse mit den untransfizierten CD24^{-/-} präB-Zellen N232.18, die CD24 transfizierten 18H18, CD24^{+/+} und die daraus resultierenden Revertanten 18H18 CD24^{-/-}. Auch hier waren deutliche Unterschiede sichtbar. Von den CD24^{+/+} Zellen transmigrierten in diesem Zeitraum ca. dreimal so viele wie von den CD24^{-/-} Zellen.

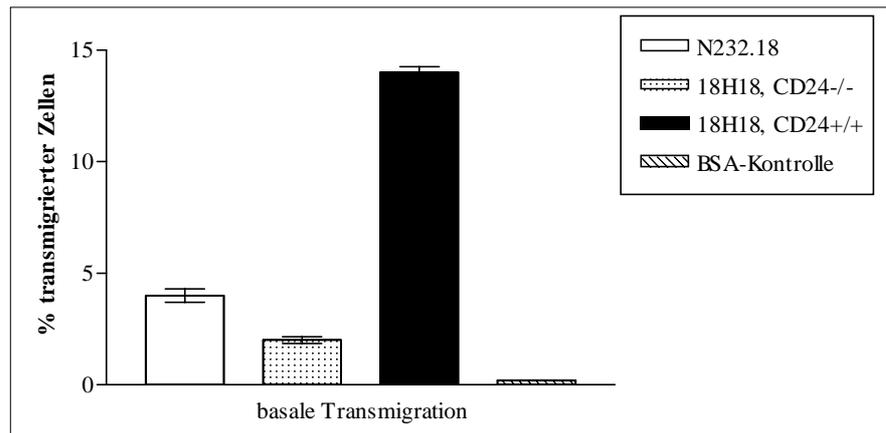


Abb. 32 Basale Transmigration der CD24^{-/-} (N232.18 und 18H18 CD24^{-/-}) und CD24^{+/+} (18H18) präB-Tumorzellen auf FN40. Rechts ist die Transmigration in der BSA-Kontrolle dargestellt.

2.6 Untersuchungen mit Knochenmarks präB-Lymphozyten

Um auszuschließen, daß es sich bei dem beobachteten Unterschied nicht um ein Artefakt der Tumorzelllinien handelte, wurden die gleichen Versuche mit Knochenmarkszellen aus CD24^{+/+} und CD24^{-/-}-Mäusen wiederholt. Hierzu wurde das Knochenmark der Mäuse präpariert und in einer Whitlock-Witte-Knochenmarkskultur die präB-Zellen angereichert. Nach 3 Wochen Kultur wurden die Zellen gerettet und für Transmigrationsversuche eingesetzt. Als Migrationssubstrat diente FN40, es wurden insgesamt 5×10^5 Zellen pro Versuchsansatz eingesetzt und die transmigrierten Zellen gezählt. Von den CD24^{-/-} Zellen migrierten etwa 2% der eingesetzten Zellen durch die mit Substrat beschichtete Membran, von den CD24^{+/+} Zellen fast 11% (Abb. 33). Die Expression des CD24 wirkt sich auch auf die α_4 -vermittelte Migration der Zellen aus.

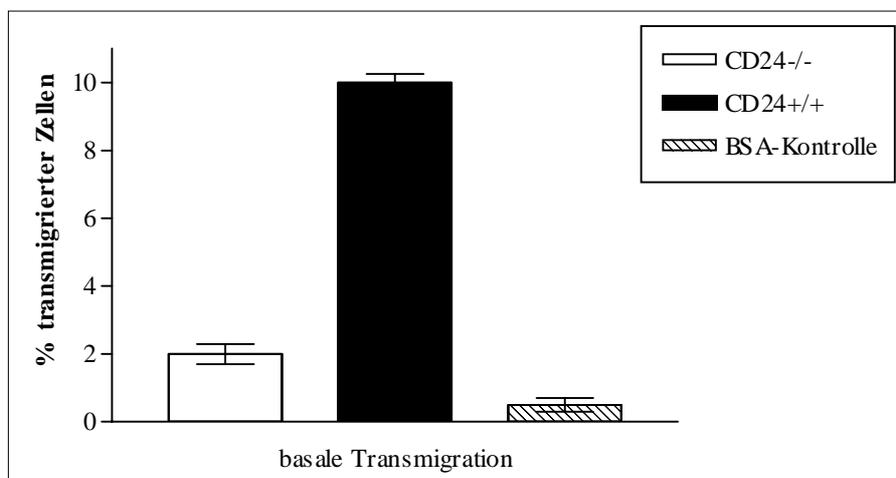


Abb. 33 Basale Transmigration der CD24^{-/-} und CD24^{+/+} Knochenmarkszellen auf FN40. Rechts ist die Transmigration in der BSA-Kontrolle dargestellt.

Bei der Präparation der Knochenmarkszellen aus CD24^{-/-} und CD24^{+/+} Mäusen fiel auf, daß die CD24^{-/-} Tiere deutlich mehr Knochenmarkszellen aufwiesen, als die CD24^{+/+} Tiere. Abb. 34 stellt den Unterschied in der totalen Anzahl der Knochenmarkszellen graphisch dar. Präpariert wurden die Knochenmarkszellen aus insgesamt jeweils 13 Mäusen. Möglicherweise hängt dieser Unterschied in der Zahl der Knochenmarkszellen mit dem veränderten Phänotyp der CD24^{-/-} Zellen zusammen (siehe oben).

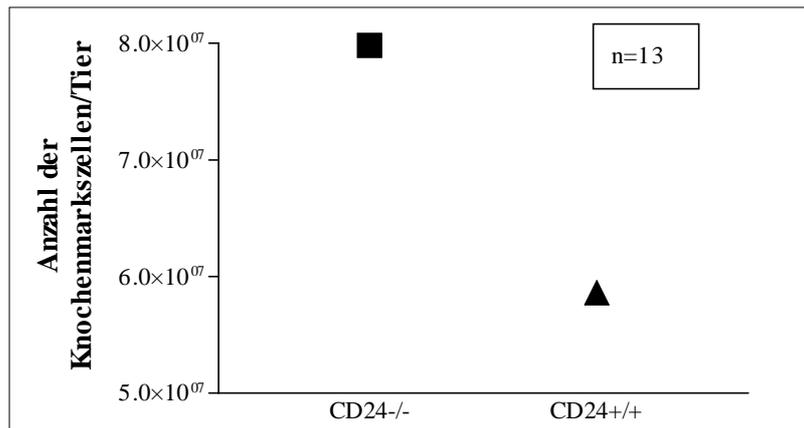


Abb. 34 Totale Anzahl der Knochenmarkszellen bei der Präparation aus CD24^{+/+} und CD24^{-/-} Mäusen. Gezeigt sind die zusammengefaßten Zahlen aus Femur und Tibia von jeweils 13 Tieren.

2.7 CD24 und α_4 lokalisieren in den Rafts

Im ersten Teil der Ergebnisdarstellung wurde die Rolle der Rafts bei der Regulation des LFA-1-Integrins in T-Lymphozyten ausführlich beschrieben. In Analogie sollte geklärt werden, ob die interessanten Moleküle CD24 und α_4 in den Membranmikrodomänen kolokalisierten. Eine Western-Blot Analyse sollte einen ersten Hinweis geben. Zu diesem Zweck wurden von CD24^{+/+} (18H18) und CD24^{-/-} Zellen (N232.18) jeweils DIG-Fraktion, zytosolische und Membran-Fraktion präpariert. Die Proteine wurden organisch gefällt und im SDS-Page aufgetrennt. Anschließend wurde die Western Blot Analyse mit CD24-spezifischen monoklonalen Antikörpern und mit einem anti- α_4 -Serum durchgeführt. Bei dem anti- α_4 -Serum handelte es sich um ein monospezifisches, polyklonales Kaninchenserum, gerichtet gegen den zytoplasmatischen Teil des α_4 -Integrins.

Abb. 35 zeigt das Ergebnis der Analyse: CD24 war wie erwartet in den CD24^{+/+}-Zellen zum größten Teil in den Rafts lokalisiert. Vom gesamten in der Membranfraktion vorhandenen α_4 -Integrin findet sich nur ein relativ geringer Anteil in den Rafts. Die α_4 -Kette stellte sich

hauptsächlich als eine 150 kD-Bande dar (α_4 150), zusätzlich war eine Bande bei 70 kD zu beobachten. Diese Bande entspricht dem α_4 70, einem proteolytischen Spaltprodukt der α_4 -Kette, die auf der Membran vorkommt (Zeller et al, 1998). Das entsprechende Gegenfragment α_4 80 ist aufgrund des fehlenden Epitops für den Antikörper nicht sichtbar im Blot.

Die CD24^{-/-} Zellen wiesen eine ähnliche Verteilung der Moleküle auf, natürlich war hier aufgrund des Phänotyps kein CD24 detektierbar.

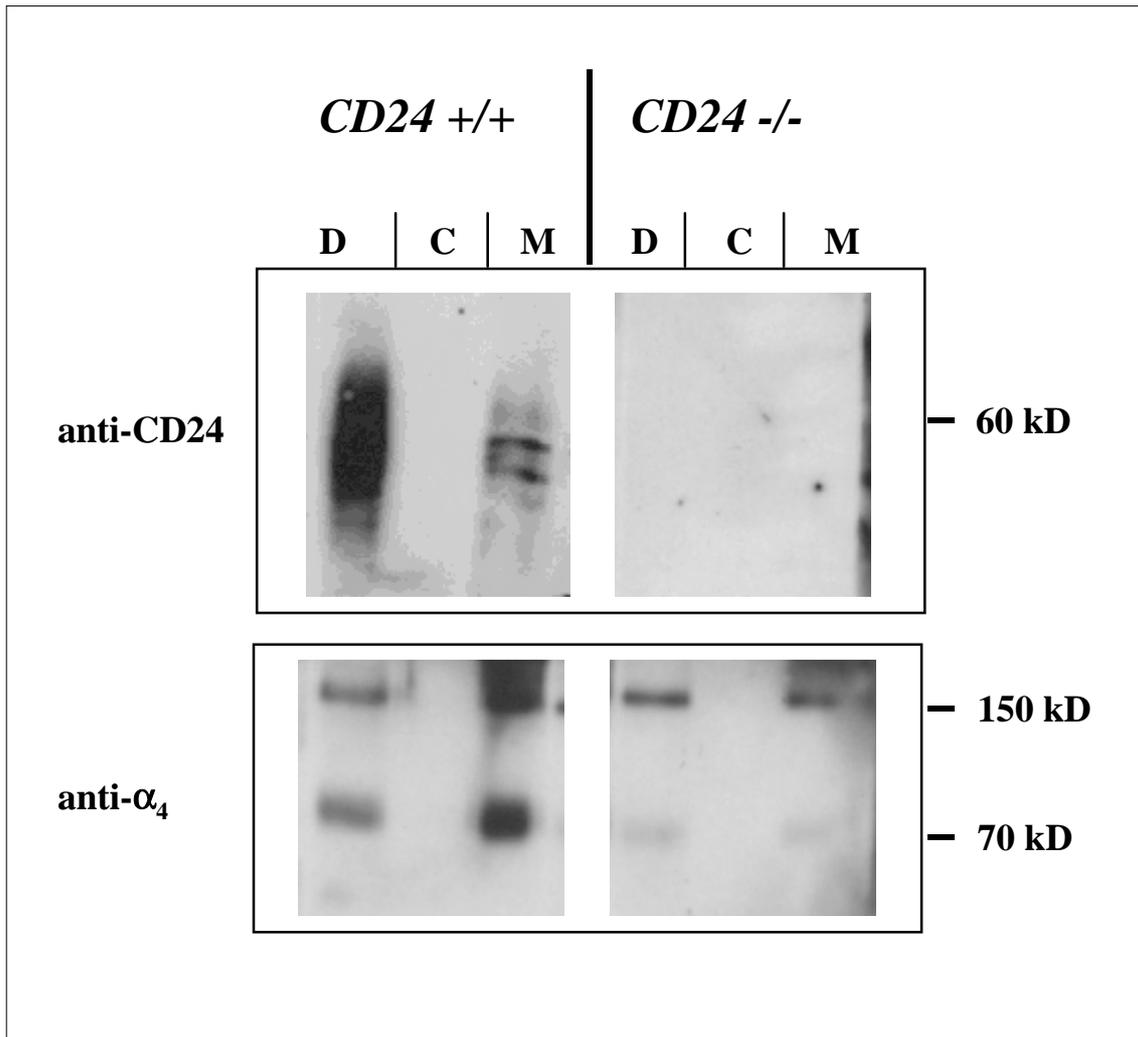


Abb. 35 Western Blot Analyse mit mAk M1.69 gegen CD24 und einem polyklonalen Antikörper gegen das α_4 -Integrin. Analysiert wurden die DIG-Fraktion (D), die zytosolische Fraktion (C) und die Membranfraktion (M) aus CD24^{+/+} und CD24^{-/-} präB-Zelllinien.

Als nächstes wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an lebenden Zellen durchgeführt, um die Verteilung des α_4 -Integrins auf der Zelloberfläche zu analysieren. Dazu

wurden N232.18 und 18H18 Zellen mit einem Cy3-gekoppelten Antikörper gegen das α_4 -Integrin (mAk 5/3-Cy3) gefärbt und im Laser-Scanning-Mikroskop analysiert.

Abb. 36 zeigt, daß auf beiden Zellarten das α_4 -Integrin nicht homogen auf der Zelloberfläche verteilt war, es lag eindeutig in Clustern vor.

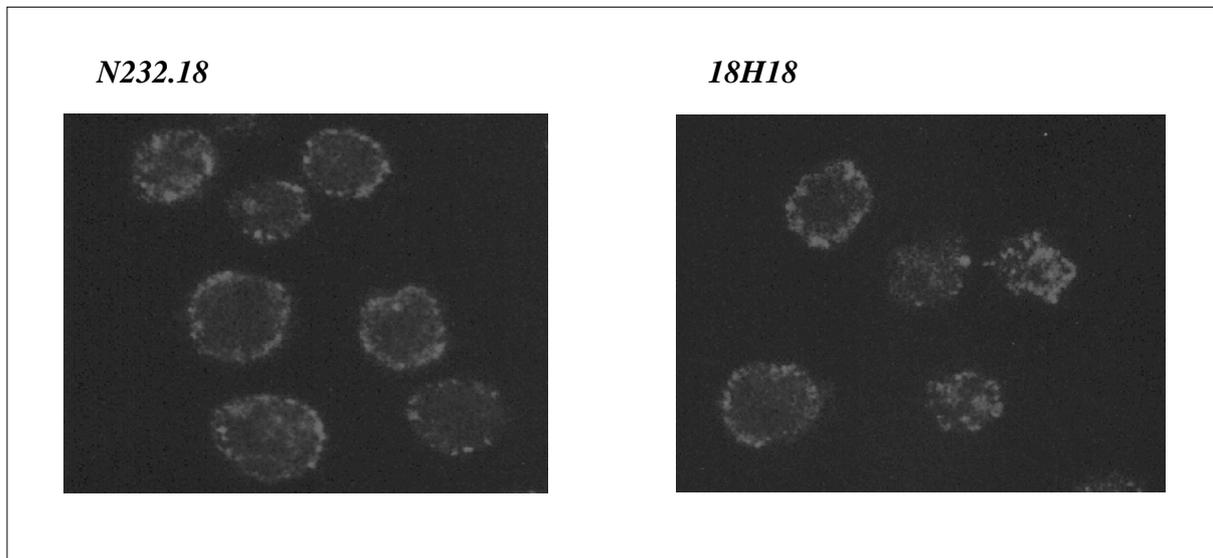


Abb. 36 N232.18 und 18H18 gefärbt mit einem Cy3-gekoppelten Antikörper gegen das α_4 -Integrin (mAk 5/3-Cy3). Die Zellen wurden vor der Färbung mit 1% Formaldehyd in PBS fixiert.

2.8 Die Rafts sind essentiell für die Bindung von CD24^{+/+} Zellen

Wie bereits oben beschrieben, war in den untersuchten präB-Zellen ein Unterschied in der basalen Bindung an FN40 in Abhängigkeit von CD24 zu beobachten. CD24 ist hier, wie die Western Blots zeigen, teilweise in den Rafts lokalisiert. Versuche, bei denen CD24 wie bei den Thymozyten im vorherigen Kapitel, über Antikörper vernetzt wird, sollten einen ersten Hinweis auf die Rolle der Rafts bei der Bindung der CD24^{+/+} Zellen an α_4 -Substrat geben. Abb. 37 zeigt einen entsprechenden Bindungsversuch auf dem α_4 -Substrat FN40. Die CD24^{+/+} Zellen 18H18 wurden mit CD24-spezifischem Antikörper (mAk M1.69) für 5 Min bei RT vorinkubiert und für 30 Min an immobilisiertes FN40 binden gelassen. Durch Gabe des Antikörpers ließ sich die Bindung der Zellen dosisabhängig auf fast das Fünffache des Ausgangswertes steigern. Die untere Kurve zeigt das Bindungsverhalten der Zellen auf dem Blockierungsgens BSA, hier gab es keine Antikörper-vermittelten Effekte. Es läßt sich daher

hier feststellen, daß in den präB-Zellen ein ähnlicher Aktivierungsmechanismus vorliegt, wie er bereits für LFA-1 an T-Lymphozyten beobachtet wurde.

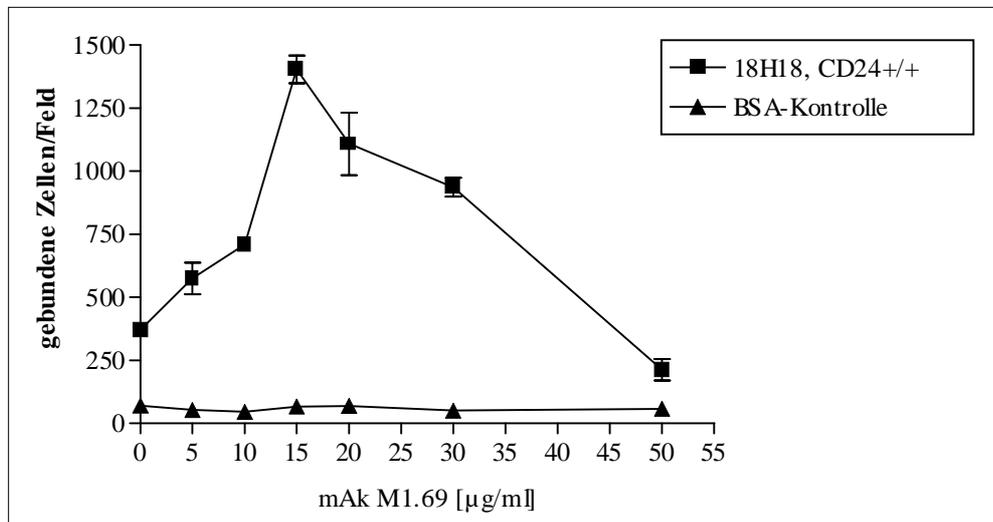


Abb. 37 Bindung der CD24+/+ Zellen 18H18 an FN40. Aktivierung durch einen Antikörper gegen CD24 (mAk M1.69) in verschiedenen Konzentrationen. Die Zellen wurden für 5 Min bei RT mit dem Antikörper vorinkubiert und dieser während des gesamten Bindungsversuchs auf den Zellen belassen. Die untere Kurve zeigt die Bindung an BSA als Kontrolle.

Um den Einfluß der Rafts auf die Unterschiede im basalen Bindungsvermögen zu untersuchen, wurden die CD24+/+ Zellen für 20 h mit dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Pravastatin vorbehandelt und somit durch Inhibition der Cholesterin-Neusynthese die Rafts in der Zellmembran zerstört. Anschließend wurden Bindungsversuche durchgeführt. Nach der Behandlung sank das Bindungsvermögen der CD24+/+ Zellen um etwas mehr als 50 % verglichen mit den unbehandelten Zellen (Abb. 38). Die unspezifische Bindung an BSA blieb unverändert. Rafts scheinen also auch bei diesen Zellen die α_4 -Integrin-vermittelte Bindung zu beeinflussen.

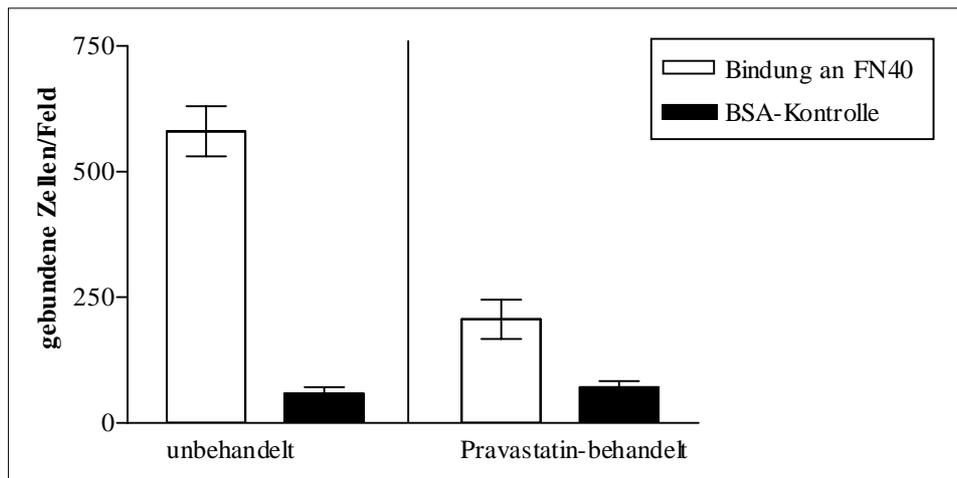


Abb. 38 Basale Bindung der CD24^{+/+} Zellen 18H18 an FN40. Die weißen Balken zeigen die Bindung an FN40, die schwarzen Balken die Bindung an BSA als Kontrolle. Links sind die unbehandelten Zellen dargestellt, rechts die Pravastatin-behandelten.

2.9 Die Bindung CD24^{-/-} Zellen kann durch externe Gabe von löslichem CD24 rekonstituiert werden

Die vorangehenden Kapitel hatten gezeigt, daß das α_4 -Integrin ein Raft-Bestandteil in B-Lymphozyten ist. Diese Daten konnten aber nicht erklären, warum es zu dem unterschiedlichen Bindungsverhalten von CD24^{-/-} und CD24^{+/+} Zellen auf FN40 kommt. Diese Frage sollte in weiteren Experimenten untersucht werden.

GPI-geankerte Moleküle werden, wenn sie den Zellen in löslicher Form extern zur Verfügung gestellt werden, in die Zellmembran integriert (Cebeacauer et al, 1998). Es sollte geklärt werden, ob auch exogenes CD24 die Bindung der Zellen modifizieren konnte. Hierzu wurde CD24 affinitätschromatographisch aus ESb-MP-Tumorzellen aufgereinigt und gegen RPMI dialysiert. Die Proteinkonzentration betrug 100 $\mu\text{g/ml}$. Die CD24^{-/-} präB-Zellen wurden dann für 1 h bei 37°C mit dem löslichen CD24 in verschiedenen Verdünnungen inkubiert, anschließend nochmals ohne CD24 für 2 h bei 37°C in Medium inkubiert und für Bindungsversuche verwendet. Parallel wurde der Einbau von CD24 mittels FACS-Analyse protokolliert. Abb. 39 zeigt die Färbung der Zellen mit dem CD24-spezifischen Antikörper mAk 79 ohne bzw. nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von löslichem CD24

(sCD24). Das extern zur Verfügung gestellte sCD24 wurde von den Zellen aufgenommen und ist in der FACS-Analyse nachweisbar. Das Übereinanderlegen der einzelnen Kurven im Histogramm unten rechts macht dies besonders deutlich. Abb. 40 zeigt die gleichen Zellen im Bindungsversuch auf FN40. Die CD24^{-/-} Zellen N232.18 erlangen nach Aufnahme des löslichen CD24 fast das gleiche Bindungsvermögen wie die CD24^{+/+} Zellen 18H18. Dieser Effekt ist durch Verdünnung des gegebenen sCD24 titrierbar und korrespondiert mit der Aufnahme des Moleküls in der FACS-Analyse.

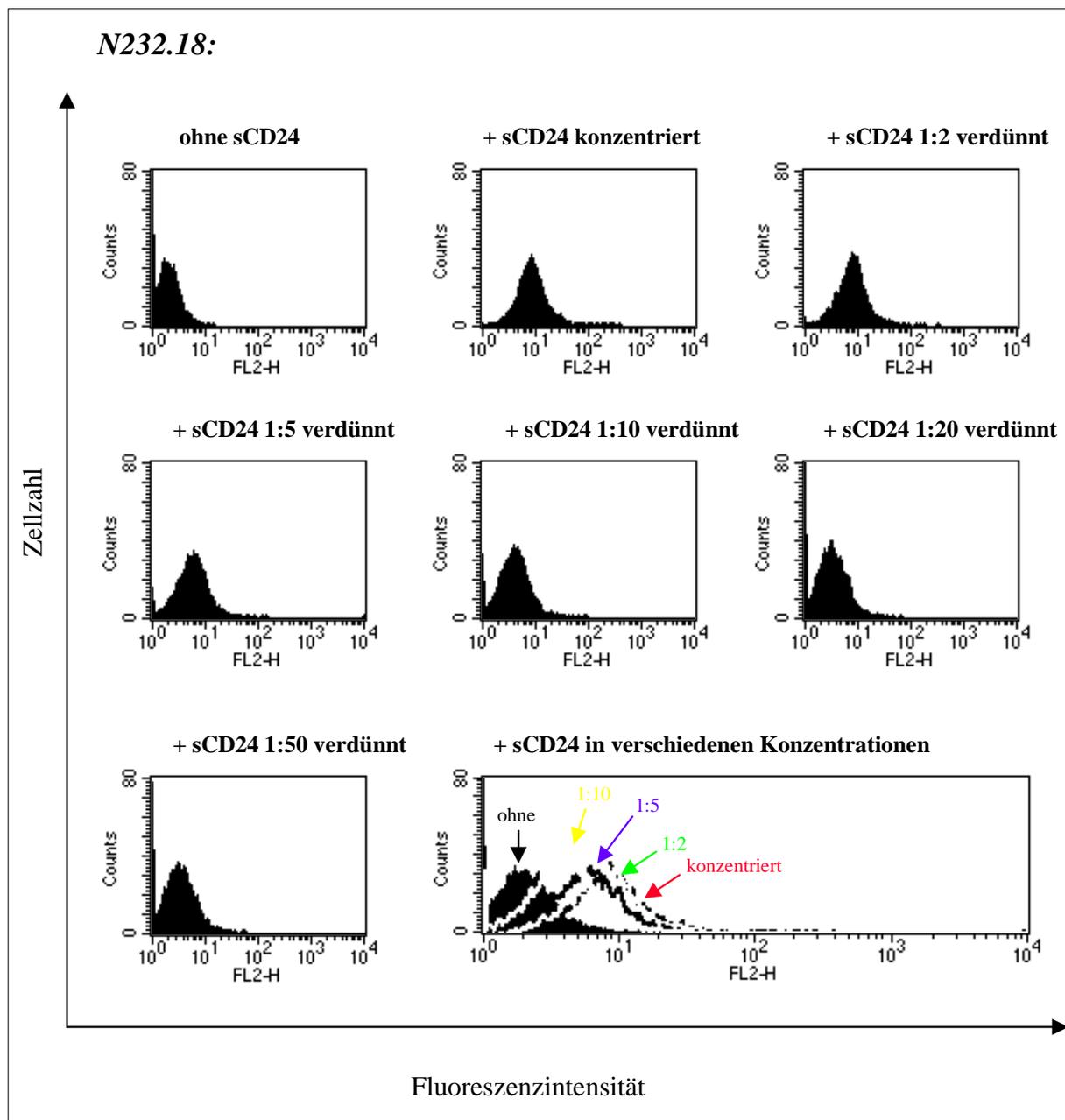


Abb. 39 FACS-Analyse der Oberflächenexpression von CD24 durch einen CD24-spezifischen Antikörper (mAk M1.69). Gezeigt sind CD24^{-/-} präB-Zellen N23218 ohne und nach Inkubation mit verschiedenen Verdünnungen von sCD24. Unten rechts ist ein Übereinanderlegen der Histogramme gezeigt.

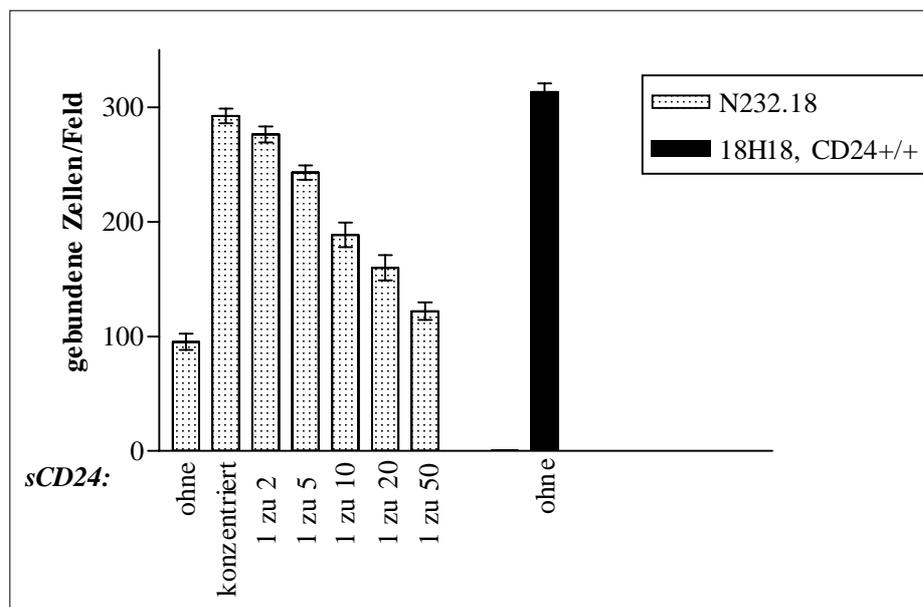


Abb. 40 zeigt die Zellen aus Abb. 39 im Bindungsversuch an FN40. Die hellen Balken zeigen die CD24^{-/-} Zellen N232.18, der schwarze Balken zeigt die basale Bindung der CD24^{+/+} Zellen 18H18, CD24^{+/+}.

2.10 Der Einbau des löslichen CD24 erfolgt in die Rafts

Wurde das aufgenommene CD24 in die Rafts eingebaut? Um dieser Frage nachzugehen wurden die Zellen wie oben beschrieben mit sCD24 inkubiert, direkt vor dem Bindungsversuch aber einer Cholesterindepletion mittels Methyl- β -Cyclodextrin unterzogen. Die Bindung wurde auch hier auf FN40 untersucht. Wie Abb. 41 zeigt, wurde durch die Cholesterin-Depletion schon das basale Bindungsvermögen der Zellen an FN40 reduziert. Nach Rekonstitution mit sCD24 banden die Zellen sehr viel besser an das Substrat, dieser Effekt wurde durch die Cholesterindepletion allerdings wieder aufgehoben. Das aufgenommene sCD24 wurde demnach in die Rafts eingebaut und kann dort seine Funktion als Regulator der α_4 -vermittelten Bindung wahrnehmen. Auch wurde parallel eine FACS-Analyse zur Protokollierung der CD24-Aufnahme durchgeführt. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen aus dem oben gezeigten Versuch und werden hier nicht dargestellt.

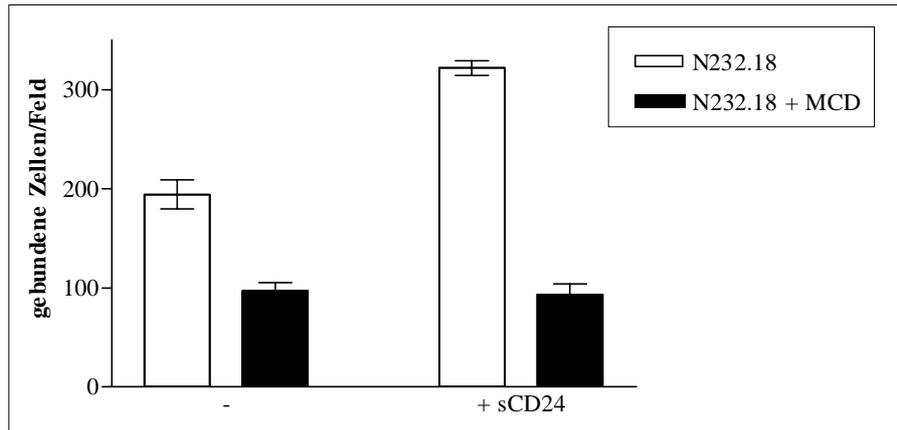


Abb. 41 Basale Bindung der CD24^{-/-} Zellen N232.18 an FN40. Rechts sind die Zellen nach Rekonstitution mit löslichem CD24 gezeigt. Die weißen Balken zeigen unbehandelte Zellen, die schwarzen Balken Zellen nach MCD-Behandlung.

2.11 Die Bindung der CD24^{-/-} Zellen läßt sich durch CD24-enhaltende DIGs restaurieren

Wie einleitend erwähnt, sind die Rafts sehr stark mit GPI-geankerten Molekülen angereichert. Auch CD24 findet sich als GPI-geankertes Molekül in der DIG-Fraktion der Zellen wieder (s. o.). Es sollte demnach versucht werden, die Zellen mit nach Zentrifugation erhaltenen DIG-Fraktion zu inkubieren in der Erwartung, daß die GPI-geankerten Moleküle auch auf diese Weise von den Zellen aufgenommen und funktionell aktiv werden. Hierzu wurden aus CD24^{-/-} und CD24^{+/+} Zellen DIG-Fraktionen präpariert und nach Verdünnung mit Wasser in der Ultrazentrifuge die Proteine der Fraktionen präzipitiert. Die Proteine wurden dann in RPMI aufgenommen und die Konzentration auf ca. 100 µg/ml eingestellt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit den DIGs vorinkubiert und Bindungsversuche durchgeführt. Abb. 42 zeigt das Ergebnis dieser Versuche: Die CD24^{-/-} Zellen zeigten wie erwartet nur geringe Bindung an FN40. Eine Inkubation mit den Proteinen der eigenen DIG-Fraktion führte zu einer geringen Verbesserung der Bindung. Wurden die Zellen jedoch mit Proteinen aus der DIG-Fraktion von CD24^{+/+} Zellen (18H18) inkubiert, erhöhte sich das Bindungsvermögen so stark, daß es vergleichbar wurde mit der basalen Bindung der 18H18 CD24^{+/+} Zellen.

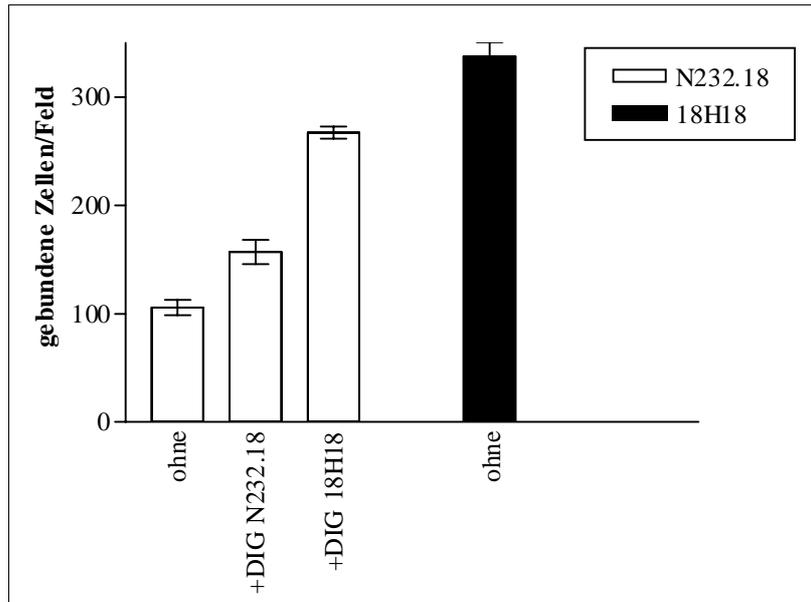


Abb. 42 Bindung der präB-Zellen an FN40. Die weißen Balken zeigen die Bindung der CD24^{-/-} Zellen N232.18 ohne und nach Rekonstitution mit verschiedenen DIG-Fractionen. In schwarz ist die basale Bindung der CD24^{+/+} Zellen 18H18 dargestellt.

Die FACS-Analyse (Abb. 43) zeigt, daß die CD24^{-/-} Zellen N232.18 nach Inkubation mit der DIG-Fraktion aus den CD24^{+/+} Zellen tatsächlich CD24 aufgenommen hatten. Die Expression des α_4 -Integrins blieb hingegen gleich und unverändert war die Expression des Gangliosid G_{M1}, welches hier mit FITC-gekoppeltem CTx angefärbt wurde.

2.12 Die Rekonstitution des Bindungsvermögens ist spezifisch für CD24

Dieses erste Experiment vermittelt den Eindruck, daß die Rekonstitution des Bindungsvermögens stark von der Präsenz des CD24 abhing. Um diesen Aspekt zu überprüfen, wurden Experimente mit einem anderen GPI-geankerten Molekül durchgeführt. Bei diesem Molekül handelt es sich um ein gelb-fluoreszierendes Protein, welches mit einem GPI-Anker versehen wurde (YFP-GPI). Das Molekül lag in Form eines Adenovirus mit entsprechender DNA vor und wurde von Dr. Patrick Keller (EMBL, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die CD24^{-/-} N232.18 Zellen wurden mit diesem Virus infiziert, was eine Expression des YFP-GPI auf der Zelloberfläche zur Folge hatte. Abb. 44 zeigt die FACS-Analyse der infizierten Zellen nach 24 h. Die Fluoreszenzanregung erfolgte hier mit einem Laser bei $\lambda = 488$ nm und gemessen wurde die Autofluoreszenz.

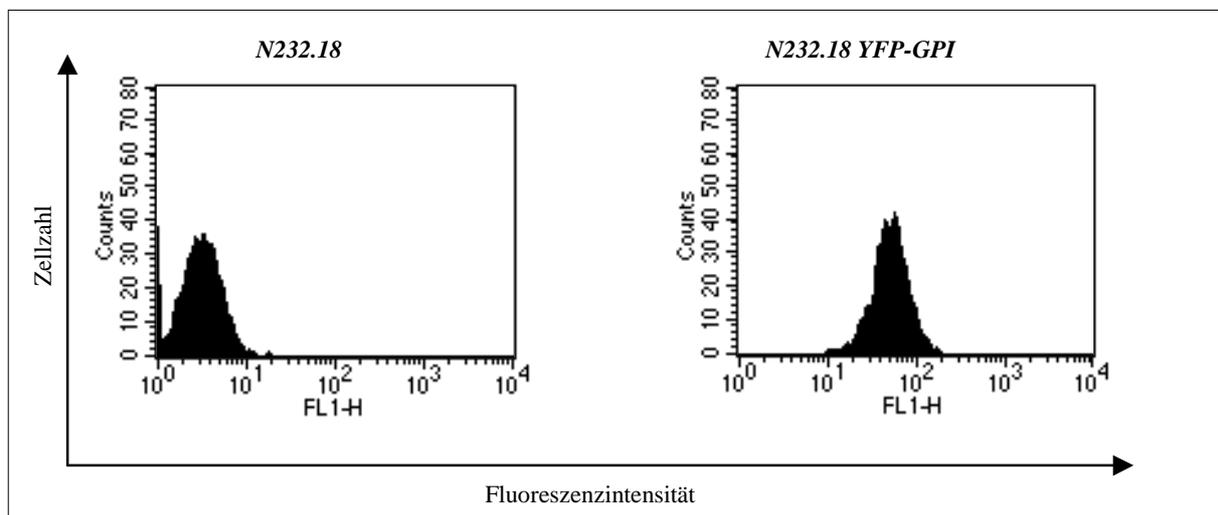


Abb. 44 FACS-Analyse der Autofluoreszenz von CD24^{-/-} N232.18. Links uninferiert, rechts nach Infektion mit adenoviralem YFP-GPI.

Aus diesen Zellen wurden DIG-Fractionen präpariert und die Fluoreszenzverteilung gemessen. Für die Analyse wurden ca. 5×10^9 Zellen eingesetzt. Die einzelnen Fraktionen wurden in einem Spektralphotometer bei einer Laseranregung von $\lambda = 488$ nm gemessen. Die Verteilung der Fluoreszenz stellt sich in Abb. 45 dar: Das GPI-geankerte YFP fand sich fast ausschließlich in den Detergens-unlöslichen Fraktionen des Gradienten.

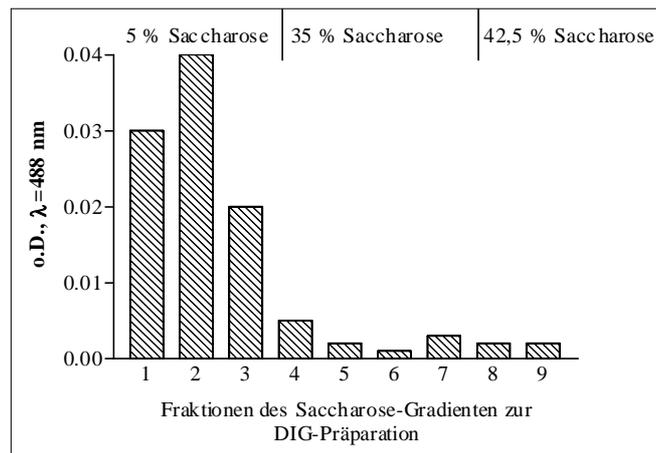


Abb. 45 Verteilung der Fluoreszenz nach Anregung bei $\lambda=488$ nm in Fraktionen des Saccharose-Gradienten zur DIG-Präparation von YFP-GPI-infizierten CD24^{-/-} N232.18.

Diese Fraktionen wurden wie oben beschrieben in der Ultrazentrifuge pelletiert und die CD24^{-/-} Zellen damit inkubiert. Parallel erfolgte eine Inkubation der Zellen mit Raft-Fractionen aus CD24^{+/+} Zellen. Wie Abb. 46 zeigt, wird das YFP-GPI von den Zellen gut aufgenommen. Die Autofluoreszenz der Zellen nimmt nach Inkubation mit YFP-GPI-DIG-Fraktion deutlich zu. Abb. 47 stellt die Zellen nach Inkubation mit den YFP-GPI-DIGs bzw. DIGs aus CD24^{+/+} Zellen im Bindungsversuch dar. Nach Inkubation mit den CD24^{+/+} DIGs nahm das Bindungsvermögen der CD24^{-/-} Zellen zu und erreicht etwa 80% der basalen Bindung von CD24^{+/+} Zellen. Nach Inkubation mit den YFP-GPI-DIG-Fractionen nahm die Bindung nur geringfügig zu. Dieser Versuch und auch die oben beschriebenen zeigen, daß die Rekonstitution des Bindungsvermögens der CD24^{-/-} Zellen spezifisch ist für die Aufnahme von CD24.

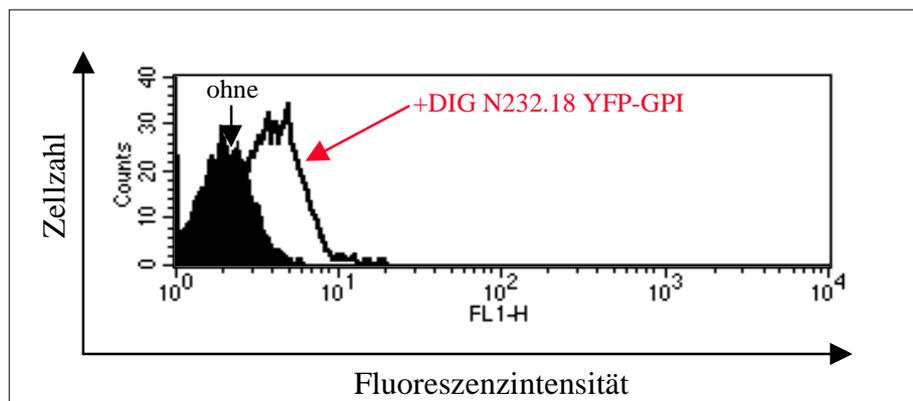


Abb. 46 FACS-Analyse der Autofluoreszenz am Beispiel der CD24^{-/-} N232.18 ohne und nach Inkubation mit der DIG-Fraktion aus YFP-GPI-infizierten N232.18.

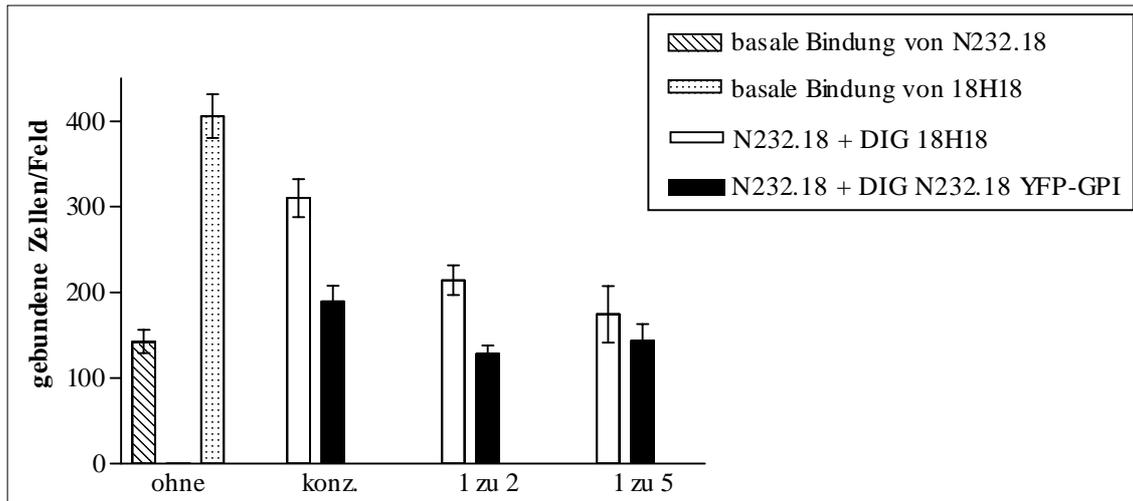


Abb. 47 Bindung von CD24^{-/-} N232.18 an FN40. Links ist die basale Bindung der Zellen gezeigt. Der gepunktete Balken zeigt die basale Bindung der CD24^{+/+} 18H18. Die weißen Balken zeigen die N232.18 nach Inkubation mit der DIG-Fraktion aus 18H18, die schwarzen Balken zeigen die Bindung nach Inkubation mit der DIG-Fraktion aus YFP-GPI-infizierten N232.18.

2.13 PI-PLC-Behandlung reduziert die Bindung von CD24^{+/+} Zellen

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, daß sowohl die Lokalisation des CD24-Moleküls als auch die spezifische Struktur für die Bindung an FN40 von Bedeutung sind.

Es sollte nun der Einfluß des extrazellulären Teiles von CD24 untersucht werden. Die Phosphoinositolspezifische Phospholipase C (PI-PLC) ist in der Lage, Proteine an ihrem GPI-Anker zu schneiden und damit größtenteils von der Zelloberfläche zu entfernen (Aigner et al, 1997 und 1998). Die CD24^{+/+} Zellen 18H18 wurden mit PI-PLC behandelt und anschließend im Bindungsversuch eingesetzt. Nach PI-PLC-Behandlung wurden die Zellen zunächst auf CD24-Expression im FACS analysiert. Abb. 48 zeigt die Färbung der Zellen mit einem CD24-spezifischen Antikörper vor und nach PI-PLC-Behandlung. Nach der Behandlung war die CD24-positive Population gänzlich verschwunden. Diese Zellen wurden für Bindungsversuche auf FN40 eingesetzt. In Abb. 49 ist das Ergebnis dargestellt: Die unbehandelten Zellen banden gut an das α_4 -Integrin-Substrat. Nach Behandlung mit PI-PLC ging das Bindungsvermögen der Zellen an FN40 drastisch zurück. Mit PMA blieben die Zellen aber in gleichem Maße aktivierbar, d. h. die Funktionsfähigkeit des α_4 -Integrins wird durch die PI-PLC-Behandlung nicht beeinträchtigt. Der extrazelluläre Teil von CD24 scheint somit an der Regulation der basalen α_4 -Integrin-Bindung zu sein.

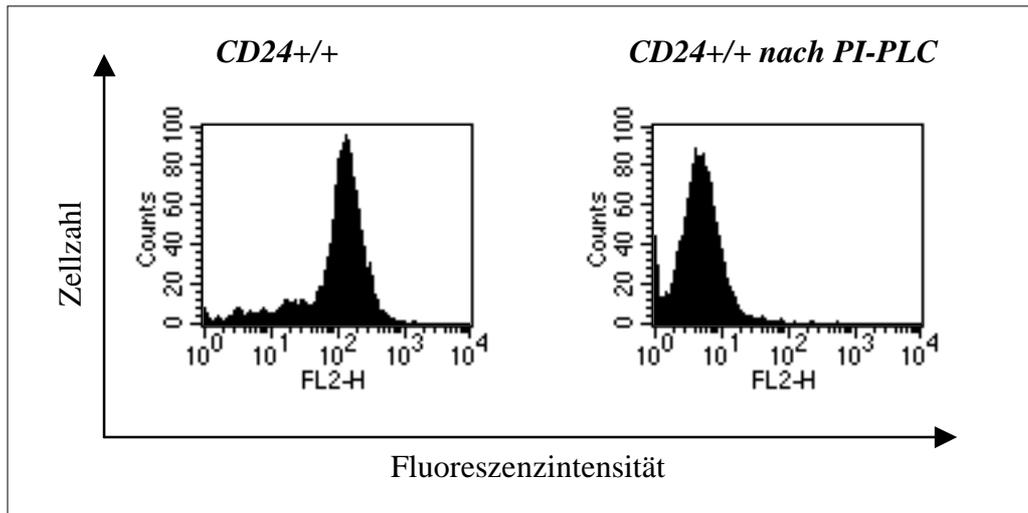


Abb. 48 FACS Analyse der Oberflächenexpression von CD24 auf CD24+/+ Zellen vor und nach PI-PLC-Behandlung.

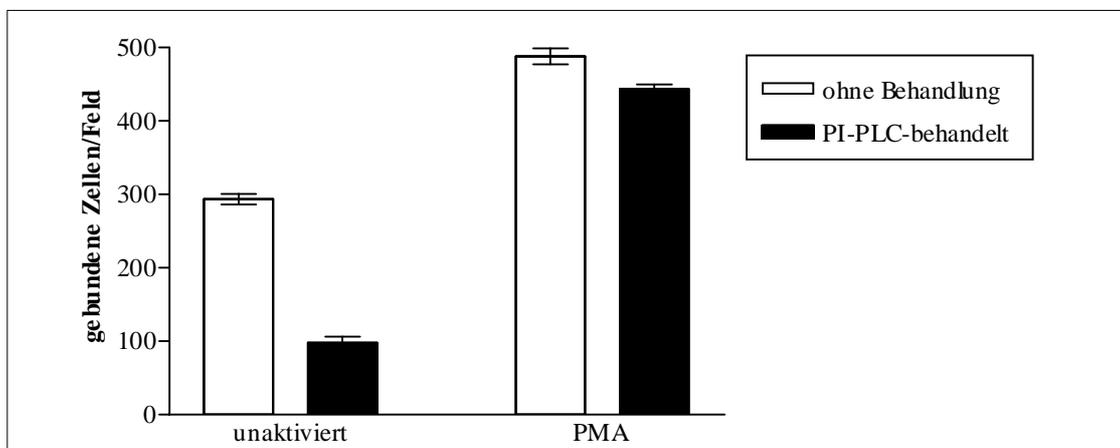


Abb. 49 Basale Bindung der CD24+/+ 18H18 Zellen an FN40. Die weißen Balken zeigen die unbehandelten Zellen, die schwarzen Balken die Zellen nach PI-PLC-Behandlung.

2.14 Die Bindung von CD24^{-/-} Zellen kann durch verschieden glykosylierte Formen von CD24 rekonstituiert werden

Wie einleitend erwähnt, handelt es sich bei CD24 um ein sehr stark glykosyliertes Molekül. Das Glykosylierungsmuster ist abhängig vom exprimierenden Zelltyp und hat Schwankungen im Molekulargewicht von bis zu 35 kD zur Folge. Die folgenden Experimente sollten Aufschluß über den Einfluß der verschiedenen Glykosylierungen von CD24 auf die α_4 -Integrin vermittelte Bindung bringen. Oben beschriebene Versuche hatten gezeigt, daß die Bindung von CD24^{-/-} Zellen durch die externe Gabe von löslichem CD24 bzw. von DIG-Fractionen, die CD24 enthalten, zur Rekonstitution der Zellbindung an FN40 führen. Es wurden nun DIGs aus verschiedenen naiven, murinen Zellen präpariert, die CD24^{-/-} Zellen damit inkubiert und der Einfluß auf das Bindungsverhalten an FN40 untersucht. Die Inkubation der Zellen erfolgte genau wie oben beschrieben. DIGs aus Thymozyten, Erythrozyten, T-Zell-Blasten und B-Zell-Blasten wurden verwendet, deren Proteingehalt auf 100µg/ml eingestellt wurde. Die Präparation erfolgte immer aus CD24^{+/+} und CD24^{-/-} Gewebe von Mäusen. Dadurch war eine Kontrolle für den evtl. CD24-spezifischen Effekt gewährleistet. In Abb. 50 ist die Bindung im Vergleich zur Bindung der CD24^{+/+} dargestellt. Das Bindungsvermögen ist angegeben in % bezogen auf 100% Bindung der CD24^{+/+} 18H18. Wie zu erwarten, zeigten die CD24^{-/-} Zellen nur etwa 30% des Bindungsvermögens der CD24^{+/+} Zellen. Nach Inkubation mit DIG-Fractionen aus den CD24^{+/+} Mauszellen erhöhte sich das Bindungsvermögen sehr deutlich, die Inkubation mit DIG-Fractionen aus CD24^{-/-} Mäusen zeigten nur einen minimalen Effekt. Die Bindung ließ sich mit DIG-Fractionen aus Thymozyten und Erythrozyten auf etwa 80% der Bindung verglichen mit den CD24^{+/+} Zellen rekonstituieren. Die Rekonstitution mit DIGs aus T-Zell-Blasten führte nur zu einer etwa 60%igen Rekonstitution in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß T-Zellen nur für kurze Zeit nach der Aktivierung CD24 exprimieren. DIGs aus B-Zell-Blasten führten nur zur etwa 50%igen Rekonstitution. Zu erwähnen ist hier, daß die Blasten CD24 bei weitem nicht so stark exprimieren wie unreife T-Zellen oder Erythrozyten, daß also bei gleicher Proteinkonzentration der DIGs der Anteil von CD24 hier geringer war.

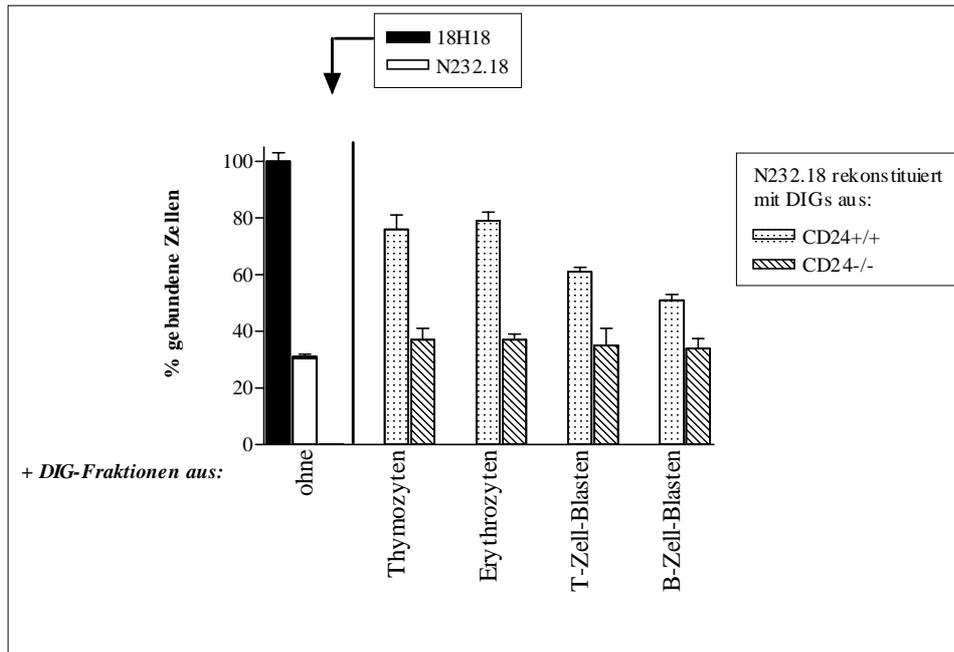


Abb. 50 Bindung der präB-Zellen an FN40. Im linken Teil des Diagramms ist die basale Bindung der CD24+/+ und CD24-/- Zellen dargestellt. Rechts werden die CD24-/- Zellen nach Rekonstitution mit DIG-Fractionen aus verschiedenen hämatopoetischen Zellen gezeigt. Die Rekonstitution erfolgte jeweils mit Zellen aus CD24+/+ (punktierte Balken) und CD24-/- (gestreifte Balken) Mäusen.

2.15 Herstellung von transmembranen CD24-Konstrukten

Diese Experimente gaben einen ersten Eindruck von der Rolle des extrazellulären Teils von CD24. Um den Einfluß des GPI-Ankers näher zu untersuchen, wurden CD24-Konstrukte hergestellt, bei denen der GPI-Anker durch den transmembranen Teil von L1 oder den transmembranen Teil von L-Selektin ersetzt wurde.

Bei L1 und L-Selectin handelt es sich um Zelladhäsionsmoleküle, die im Gegensatz zu CD24 einen transmembranen und einen zytoplasmatischen Anteil aufweisen. Die Wahl fiel auf diese beiden Moleküle, da in unserer Arbeitsgruppe mit beiden gearbeitet wurde. Die Herstellung der Konstrukte erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Abb. 51 zeigt schematisch die CD24-Konstrukte. Der extrazelluläre Teil von CD24 wurde an den zytoplasmatischen und transmembranen Teil von L1 bzw. L-Selektin fusioniert.

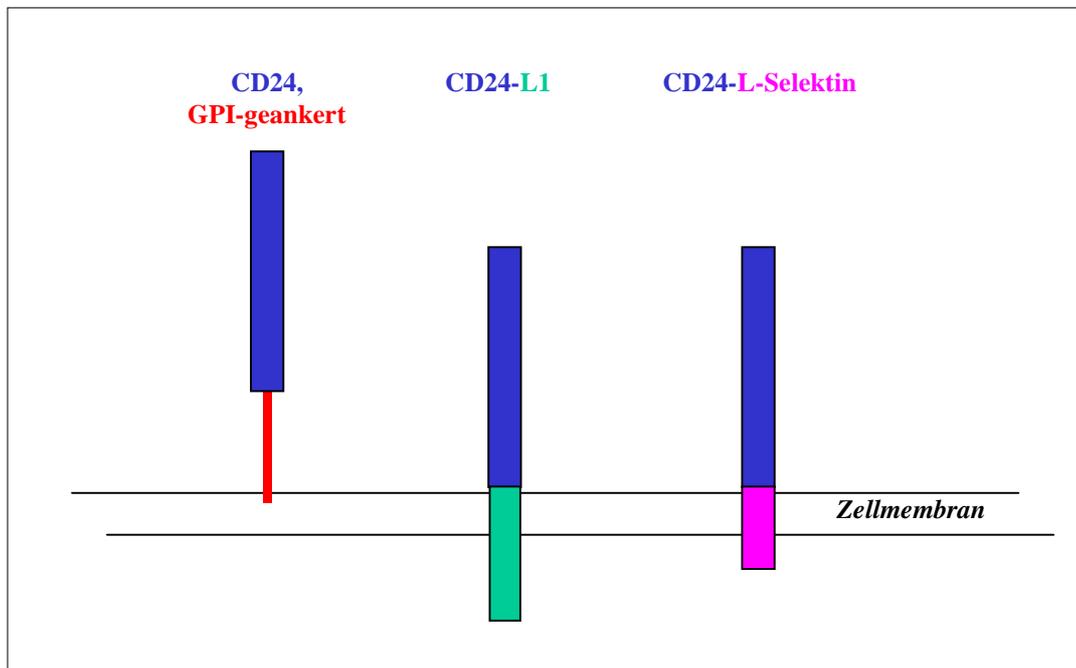


Abb. 51 Schematische Darstellung der Fusionsprodukte. Links ist die „normale“ GPI-geankerte Form von CD24 dargestellt, in der Mitte das CD24-L1-Konstrukt und rechts das CD24-L-Selektin-Konstrukt.

Die fertigen Konstrukte lagen im pCDNA3-Vektor vor. Um sicherzustellen, daß die cDNAs in Ordnung waren und auf der Zelloberfläche exprimiert werden konnten, wurden beide Konstrukte transient in CHO- bzw. in Cos-7-Zellen transfiziert. Die Transfektion erfolgte mittels Superfect-Transfektions-Kit (Qiagen). Nach 48 Stunden wurden die Zellen im FACS auf die Expression der CD24-chimären Proteine hin untersucht. Abb. 52 zeigt die Färbung der Zellen mit mAk M1.69 gegen CD24. Sowohl die CHO- als auch die Cos-7-Zellen waren mit den Konstrukten transfiziert und exprimierten diese auf der Zelloberfläche. Die Konstrukte waren prinzipiell in Ordnung und konnten an die Zelloberfläche gelangen.

Anschließend sollten die CD24-Konstrukte in die CD24^{-/-} präB-Zelllinie N232.18 transfiziert werden. Hierzu wurden verschiedene Methoden der Zelltransfektion angewandt, sowohl mit zyklischer als auch mit durch Restriktionsverdau linearisierter Plasmid-DNA. Die Transfektion durch Methoden, die auf der Lipofectamin-Methode beruhen und die Transfektion durch Elektroporation blieb in den N232.18-Zellen leider ohne Erfolg

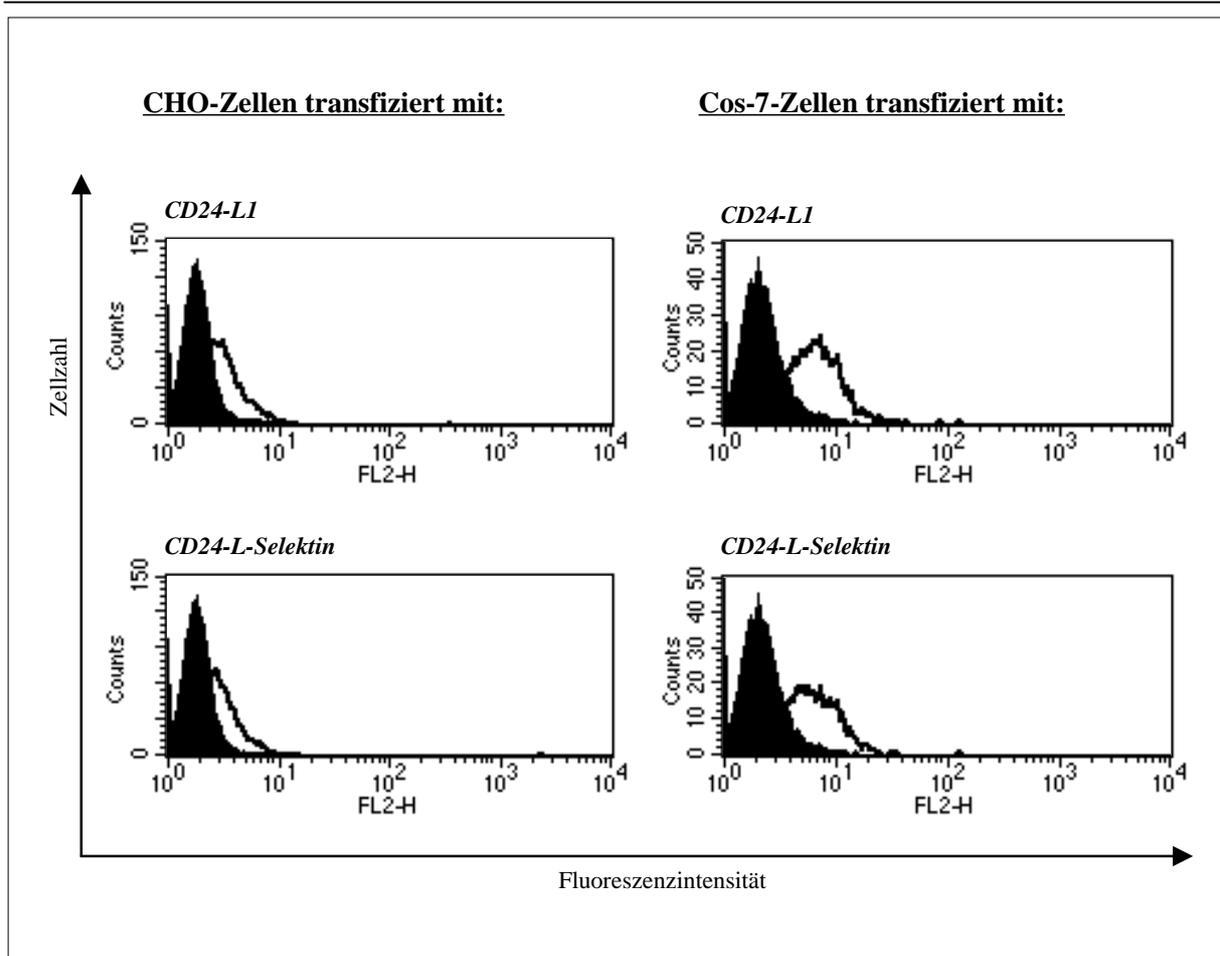


Abb. 52 Expression der CD24-Konstrukte in CHO- und Cos-Zellen. Die ausgefüllten Kurven zeigen jeweils die untransfizierten Zellen, die roten Kurven stellen die Oberflächen-Expression der Konstrukte nach Transfektion dar.

D. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden zwei Fragen untersucht. Im ersten Teil wurde die Rolle der Rafts bei der Regulation der Zelladhäsion analysiert. Ausgehend von der Integrinaktivierung über das GPI-geankerte Molekül CD24 wurde hier ein genereller Mechanismus zur Regulation der Aktivität des Leukozyten-Funktions-Antigens-1 (LFA-1) in T-Lymphozyten aufgeklärt.

Der zweite Teil der Dissertation beschäftigt sich mit der Funktion von CD24 als Raft-Molekül anhand von präB-Lymphozyten mit definiertem Phänotyp.

1. CD24 als „Raft“-Molekül

Ausgangspunkt der Arbeit zur Untersuchung der Integrinaktivität war CD24. Das murine CD24 welches auch als HSA – „heat-stable antigen“- bezeichnet wird, hat einen Proteinkern von nur 27 Aminosäuren und ist stark glykosyliert. Aufgrund des unterschiedlichen Glykosylierungsmusters variiert das Molekulargewicht je nach exprimierendem Zelltyp von 28 bis 70 kD. CD24 weist keinen transmembranen Anteil auf, es wird durch einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden. Eine alternative transmembrane Form existiert nicht (Kay et al, 1990; Wenger et al, 1991; Kadmon et al, 1992).

Das Molekül wird auf vielen unreifen hämatopoetischen Zellen exprimiert, weshalb es zunächst als Differenzierungsantigen bezeichnet wurde. Allerdings wird das murine Molekül auch auf aktivierten T-Zellen reexprimiert (Hubbe und Altevogt, 1994). Auf humanen Leukozyten wird CD24 nur von B-Lymphozyten und Granulozyten exprimiert. Auf verschiedenen Tumorzellen wurde CD24 ebenfalls nachgewiesen, wo es als Ligand für P-Selektin eine wichtige Rolle bei der Tumorausbreitung spielt (Aigner et al, 1997; Aigner et al, 1998; Friederichs et al, 2000, zur Publikation eingereicht).

Für CD24 sind bisher zwei Funktionen beschrieben: Es konnte sowohl das murine als auch das humane CD24 als Ligand für P-Selektin identifiziert werden. Außerdem ist das murine CD24 in der Lage, Signale ins Zellinnere zu senden (Kadmon et al, 1994; Hubbe und Altevogt, 1994) und in monozytären ESb-MP-Zellen können Antikörper gegen CD24 das VLA-5 Integrin aktivieren, was zu einer homotypischen Aggregation der Zellen führt (Ruppert et al, 1995). Sammar et al konnten 1997 zeigen, daß in diesen Zellen Antikörper

gegen CD24 die Phosphorylierung von *src*-Kinasen induzieren, die direkt mit CD24 assoziieren.

Aufgrund seines GPI-Ankers ist CD24 ein typisches „Raft“-Molekül. Bei den Rafts handelt es sich um kleine Lipiddomänen in der Zellmembran. Diese Rafts sind hochangereichert mit Cholesterin, bestimmten Sphingolipiden, verschiedenen GPI-geankerten Molekülen und beinhalten auch einige transmembrane Moleküle (Varma und Mayor, 1998; Friedrichson und Kurzchalia, 1998; Cinek und Horejsi, 1992). Im Ruhezustand haben die Rafts eine Größe von ca. 50 nm. Als „schwimmende Inseln“ auf der Zellmembran sind sie sehr mobil, und mehrere Rafts können zu größeren funktionellen Einheiten verschmelzen (Jacobson und Dietrich, 1999). Auf der zytoplasmatischen Seite sind die Rafts reich bestückt mit *src*-Kinasen, die durch Lipid-Modifikationen in der Membran verankert sind (Jacobson und Dietrich, 1999, Simons und Ikonen, 1997). Aufgrund der Assoziation mit Kinasen und der Flexibilität auf der Zellmembran werden die Rafts als wichtige Plattformen zur Signaltransduktion angesehen, die bei verschiedenen Zellfunktionen wichtige Funktionen besitzen. Eine wichtige Rolle wird den Rafts bei der effizienten T-Zell-Aktivierung zugesprochen. Das Clustern von Rafts führt an der Kontaktstelle von T-Zelle und APC zur Ausbildung sog. „Supramolekularer Aktivations Cluster“, die Antigen-Rezeptoren, Co-Rezeptoren, Signaling- und Adhäsionsmoleküle lokal konzentrieren (Monks et al, 1997; Viola et al, 1999). Eine direkte Rolle der Rafts bei der Regulation der T-Zell-Adhäsion konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

2. Die Rolle der Rafts bei der Regulation der Zelladhäsion

In spezifischen Bindungsversuchen wurde der Einfluß von Antikörpern gegen CD24 auf die Adhäsion von Thymozyten an ICAM-1 untersucht. Die Antikörper konnten eine Bindung der Zellen an ICAM-1 induzieren. Wie Inhibitionsexperimente zeigten, wurde diese Bindung durch das LFA-1 Integrin und ICAM-1 vermittelt. Antikörper gegen transmembrane Moleküle waren nicht in der Lage, eine solche Bindung zu induzieren. Ein Antikörper gegen das ebenfalls GPI-geankerte Thy1 zeigte einen ähnlichen Effekt, allerdings war hier eine viel höhere Dosis des Antikörpers notwendig.

Es gibt zwei grundsätzliche Wege, wie der Aktivierungszustand von Integrinen verändert werden kann. Einmal kann durch eine Konformationsänderung im extrazellulären Teil des Integrins eine Ligandenbindungsstelle geschaffen werden, hier spricht man von einer Erhöhung der Affinität des Moleküls. Zum anderen kann durch lokale Konzentration

mehrerer einzelner Integrine ebenfalls das Bindungsvermögen erhöht werden. In diesem Fall spricht man von einer Erhöhung der Avidität. Abb. 53 skizziert nochmals schematisch die beiden Wege.

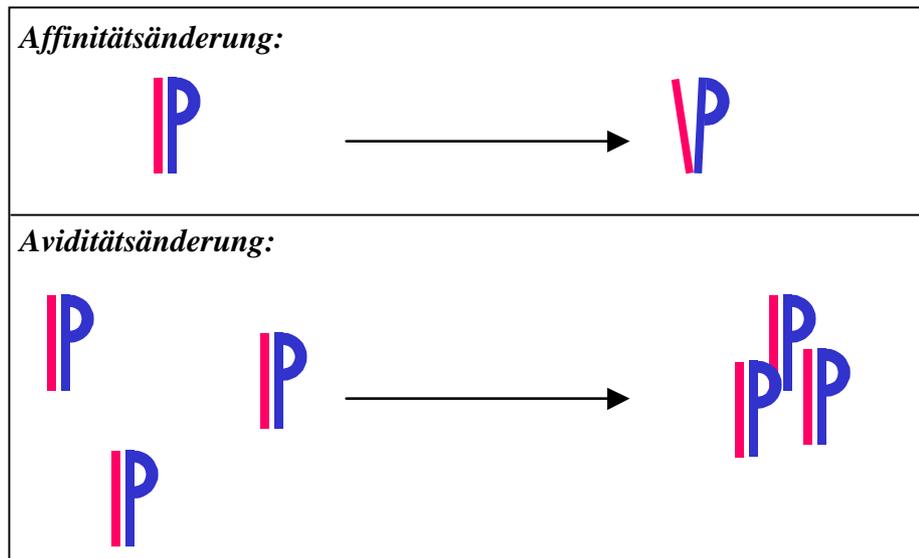


Abb. 53 Schematische Darstellung der zwei Wege zur Regulation der Integrinaktivität. In rot-blau sind die Integrin-Heterodimere dargestellt. Oben ist die Änderung der Konformation des Integrins, welche als Affinitätsänderung bezeichnet wird, zu sehen. Unten wird das lokale Clustern mehrerer einzelner Integrine gezeigt, welches einer Aviditätsänderung entspricht.

Da nur Antikörper gegen GPI-geankerte Moleküle zur erhöhten Bindung von Thymozyten an ICAM-1 führten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch ein Clustern der Rafts, in welchen sich sowohl CD24 als auch Thy1 als GPI-geankerte Moleküle befinden sollten, es zu einer lokalen Erhöhung der Integrindichte, also zu einer Veränderung der Avidität des involvierten Integrins kommt. Dies würde voraussetzen, dass nicht nur das GPI-geankerte CD24, sondern auch das transmembrane LFA-1 in den Rafts lokalisiert ist. Von einigen transmembranen Molekülen wurde eine solche Lokalisation beschrieben (Brown und London, 1998), nicht jedoch von Integrinen. Bekannt ist, dass in verschiedenen polarisierten Zellen β_1 - und zum Teil auch β_2 -Integrine mit Caveolin assoziieren und in den Caveolae lokalisieren (als Review siehe Chapman et al, 1999; Schwab et al, 2000). Caveolae teilen einige Eigenschaften mit den Rafts, z. B. die Unlöslichkeit in Detergenzien wie Triton X-100, sind aber dennoch nicht mit den Rafts gleichzusetzen (Brown und London, 1998; Janes et al, 2000). Die Funktionalität der Assoziation von Caveolin mit Integrinen liegt hier in der intrazellulären Signaltransduktion ausgehend von den Integrinen. In lymphoiden Zellen ist eine Assoziation

von Integrinen mit den Rafts bisher nicht beschrieben, das Gleiche gilt für einen Einfluß der Rafts auf die Regulation der Zelladhäsion.

Die biochemische Analyse der Detergens-unlöslichen, der zytosolischen und der Membranfraktion von Thymozyten zeigte, daß CD24 fast ausschließlich und LFA-1 zu etwa etwa 70 % in den Rafts lokalisieren. Für CD24 als GPI-geankertes Molekül war dies zu erwarten, erstaunlich ist das Ergebnis für LFA-1. Um diese Resultate zu verifizieren, wurden die Zellen zur Analyse im Laser-Scanning-Mikroskop auf der Oberfläche angefärbt für CD24 und jeweils für die beiden Integrin-Ketten (α_L und β_2) von LFA-1. Auch hier zeigte sich in der Profilanalyse der Fluoreszenzverteilung ein ähnliches Verhältnis in der Kolo-kalisation von CD24 und den beiden Integrin-Ketten.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß beide Moleküle in den Rafts kolo-kalisieren, wurde nun ein anderes Molekül verwendet, um die Rafts zu vernetzen. Es handelte sich hierbei um G_{M1} . G_{M1} ist ein Gangliosid, welches in den Rafts stark angereichert ist und als Raft-Marker verwendet wird (Janes et al, 2000; Harder et al, 1998; Brown und London, 1998). G_{M1} ist das „Ziel-Molekül“ von Cholera Toxin (CTx), dem Bakterien-Toxin von *Vibrio cholera* (Zitzer et al, 1999). Eine Vielzahl von Bakterien-Toxinen haben Raft-Moleküle als Bindungspartner. Die Rezeptoren der Gifte von *Aeromonas hydropholia* (Nelson et al, 1997), *Bacillus thuringiensis* (Lorence et al, 1997) und *Streptococcus pyogenes* (Jacobs et al, 1998) sind alle GPI-geankerte Moleküle und als solche präferentiell in den Rafts lokalisiert. Dies gilt auch für das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS), welches an das GPI-geankerte CD14 bindet (Ulevitch und Tobias, 1994).

CTx ist ein hexameres Molekül, welches aus einer A- und fünf B-Untereinheiten besteht. Die Bindung von CTx an G_{M1} erfolgt über je eine B-Untereinheit. Die A-Untereinheit ist die katalytische Domäne des CTx und initiiert in der Zielzelle eine G-Protein-abhängige Signalkaskade (Montecucco et al, 1994). Aufgrund seiner Struktur ist CTx im Bindungsvermögen pentavalent, d. h. ein CTx-Molekül kann fünf G_{M1} -Moleküle binden. Aus diesem Grund eignet sich CTs hervorragend, um Rafts auf der Zelloberfläche zu clustern (Viola et al, 1999; Harder et al, 1998; Xavier et al, 1998). CTx wurde als Gesamtmolekül (CTx) und als B-Untereinheit (CTx-B) eingesetzt. In Bindungsstudien mit Thymozyten an ICAM-1 konnte ich zeigen, daß die Inkubation der Zellen mit dem Gesamtmolekül zu einer Erhöhung der Bindung über LFA-1 führte, nicht jedoch die Inkubation mit der B-Untereinheit. Um auszuschließen, daß es sich bei dem beobachteten Effekt um eine Auswirkung der durch die A-Untereinheit initiierten Signalkaskade (s. o.) handelt, wurden die Zellen bei dem Bindungsversuch mit der B-Untereinheit inkubiert, die dann mit einem

spezifischen Antikörper vernetzt wurde. Auch hier war eine LFA-1 vermittelte Bindungserhöhung deutlich erkennbar. Die Vernetzung der Rafts führte eindeutig zu einer Erhöhung der Aktivität von LFA-1. Das lokale Clustern des LFA-1-Integrins konnte auch immunfluoreszenzmikroskopisch im Laser-Scanning-Mikroskop sichtbar gemacht werden.

Ausgehend von den erhaltenen Ergebnissen wurde die folgende Abfolge der Ereignisse postuliert: 1. Die Vernetzung von Raft-assoziierten Molekülen führt zum Clustern der Rafts auf der Zelloberfläche. 2. Da LFA-1 in den Rafts lokalisiert ist, kommt es zum Ko-Clustern des Integrins. 3. Das Clustern des LFA-1 Integrins führt zu einer lokalen Konzentrationserhöhung und zur Bindungsverstärkung durch eine erhöhte Integrinavidität. Abb. 54 stellt diesen Weg schematisch dar.

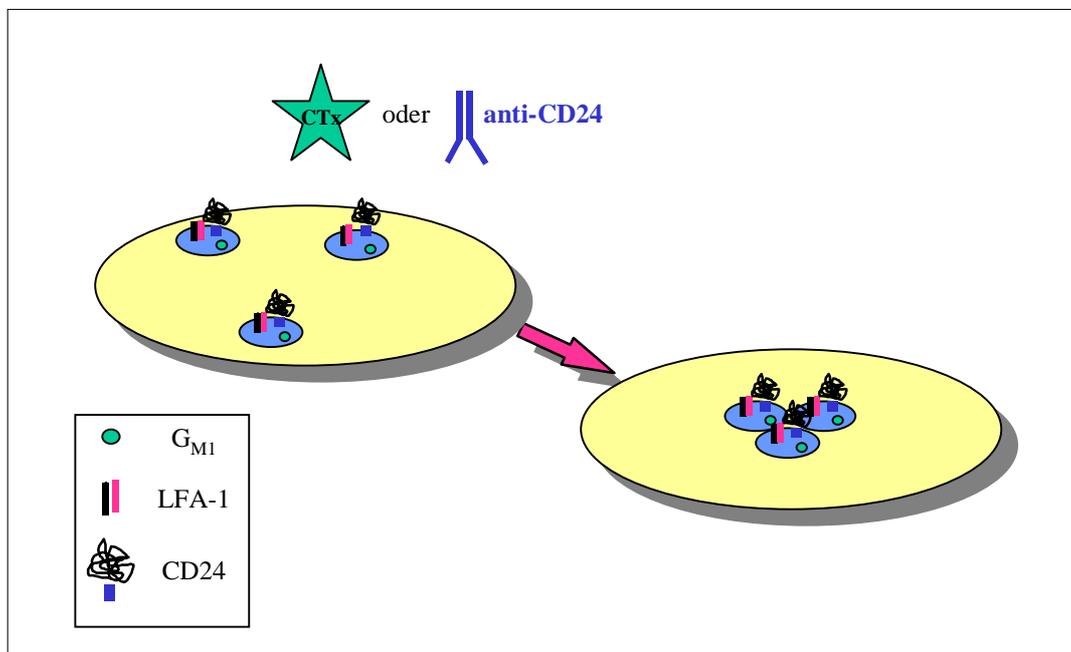


Abb. 54 Schematische Darstellung des Raft-Clusters durch CTx oder Anti-CD24-Antikörper. Die großen gelben Flächen stellen die Zellmembran dar. Die darauf verteilten blauen „Inseln“ skizzieren die Rafts. Die dargestellten Moleküle erklären sich aus der Legende. Links ist eine ruhende Zellmembran zu sehen, rechts die gleiche Zellmembran nach Clustern der Rafts durch CTx oder CD24 Antikörper.

3. Raft-Clustern induziert eine Signalkaskade in den Zellen

Nachdem dieser Weg der Integrin-Aktivierung dargestellt werden konnte, sollte er mit anderen Wegen der Integrinaktivierung verglichen werden. Hierzu wurden Bindungsversuche

unternommen, bei denen die Zellen mit verschiedenen spezifischen Inhibitoren inkubiert wurden.

Die Aktivierung von LFA-1 kann erreicht werden durch die externe Zugabe von Kationen wie Mn^{2+} oder Mg^{2+} /EGTA. Die Kationen umgehen den physiologischen Aktivierungsweg, indem sie direkt die Konformation des Integrins ändern und somit die Affinität erhöhen (Gahmberg, 1997; Stewart et al, 1998, Neeson, et al 2000). In Vorexperimenten hatte sich für die Thymozyten gezeigt, daß sich das LFA-1-Integrin am besten mit Mg^{2+} /EGTA aktivieren ließ. Die LFA-1-Cluster-Formation und somit eine Erhöhung der Integrin-Avidität kann artifiziell durch die Behandlung von Lymphozyten mit Phorbolestern oder anderen Substanzen, die einen Ca^{2+} -Einstrom zur Folge haben, induziert werden (Stewart et al, 1998). Diese Art der Aktivierung hängt von der lateralen Diffusion von LFA-1 und der Interaktion mit dem Zytoskelett ab (Gahmberg, 1997; Penninger und Crabtree, 1999; Stewart et al, 1998) und entspricht einer Änderung der Integrinavidität (Neeson et al, 2000). Diese beiden Wege der Aktivierung von LFA-1 wurden mit der Aktivierung durch Raft-Clustern verglichen. Zum Clustern der Rafts wurden Antikörper gegen das GPI-geankerte CD24 und CTx verwendet. Vor den Bindungsversuchen an ICAM-1 wurden die Thymozyten wie oben erwähnt mit verschiedenen Inhibitoren behandelt.

Wortmannin, ein Inhibitor für die PI3-Kinase, inhibierte die Aktivierung von LFA-1 durch Raft-Vernetzung zu etwa 65 %, verglichen mit der Aktivierung ohne Inhibition. Die Aktivierbarkeit durch Kationen oder PMA blieb unbeeinflusst. Die PI3-Kinase ist involviert in die Aktivierung des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins auf Blutplättchen und Megakaryozyten (Zauli et al, 1997). Außerdem spielt die PI3-Kinase eine wichtige Rolle bei Phosphorylierungsereignissen während der Reorganisation des Zytoskeletts, bei der Wachstumsfaktor-abhängigen Mitogenese, der Prävention der Apoptose, bei der Zytokinproduktion und dem endozytotischen Verkehr (Jones and Howell, 1997; Hooshmand-Rad et al, 1997; Duronio et al, 1998). Bezüglich der Aktivierung von β_2 -Integrinen sind besonders die Arbeiten aus der Gruppe um Waldemar Kolanus interessant. Die Gruppe konnte zeigen, daß die PI3-Kinase sehr stark in die Regulation der β_2 -Integrin-vermittelten Adhäsion von humanen Jurkat-Zellen an ICAM-1 involviert ist (Kolanus et al, 1996; Nagel et al, 1998). Bei Jurkat-Zellen handelt es sich um ein humanes T-Zell-Lymphom. Die Expression einer konstitutiv aktiven Form der Kinase reichte aus, um die LFA-1-vermittelte Adhäsion dieser Zellen an ICAM-1 zu induzieren. Dabei kommt es auch zu einer Membranrekrutierung des Moleküls Cytohesin-1 (Nagel et al, 1998). Dieser Effekt kann durch Wortmannin inhibiert werden. Cytohesin-1 ist ein 47 kD großes Molekül, das in verschiedenen Systemen spezifisch mit der

zytoplasmatischen Domäne von LFA-1 interagiert (Kolanus et al, 1996). Die Überexpression von Cytohesin-1 in Jurkat-Zellen zeigte tiefgreifende Effekte auf die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 (Nagel et al, 1998). Mutationsanalysen der β_2 -Integrin-Kette wiesen eine Korrelation zwischen der Adhäsionsfunktion von LFA-1 und der Interaktion mit Cytohesin-1 auf (Geiger et al, 2000). Für Cytohesin-1 werden zwei Arten der Regulation von LFA-1 beschrieben. Cytohesin-1 induziert die Expression eines Aktivierungsepitops im Integrin, was einer Affinitätsregulation entspricht. Andererseits fungiert Cytohesin-1 als Austauschfaktor für Guanin-Nukleotid und diese Funktion ist essentiell für die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion und das „Zellspreading“, d. h. für die Polarisierung der Zelle unmittelbar vor der Zellmigration (Geiger et al, 2000). Die beiden Funktionen werden separat reguliert, so wird die Aktivität als Guanin-Nukleotid-Austauschpartner von Phospholipiden streng kontrolliert (Knorr et al, 2000). Bei den hier vorgestellten Daten zeigte Wortmannin einen starken Effekt auf die Aktivierung von LFA-1 durch Raft-Clustern, nicht jedoch auf die Aktivierung durch Kationen oder den Phorbolster PMA. Dies deutet auf eine starke Assoziation des Cytohesin-1-Systems mit der Bildung von Raft-Clustern hin.

Hmama et al (1999) untersuchten die LFA-1-vermittelte Bindung von Monozyten nach Bindung des Endotoxins LPS. Wie oben erwähnt, bindet LPS an das GPI-geankerte CD14. Der induzierte Signalweg involviert die PI3-Kinase, Cytohesin und kleine GTP-bindende Proteine die zur Rho-Familie gehören. Obwohl CD14 ein GPI-geankertes Molekül ist, welches erwartungsgemäß in den Rafts lokalisiert sein sollte, haben Hmama et al diesen Aspekt nicht bedacht. Die Daten stehen aber in Übereinstimmung mit dem hier präsentierten Modell zur Regulation der Integrinaktivität.

Genistein, ein Inhibitor für Tyrosin-Kinasen, zeigte den gleichen Effekt auf die Bindung von Thymozyten an ICAM-1. Die durch Raft-Clustern induzierte Bindung wurde auch hier zu etwa 65 % inhibiert, wohingegen die Kationen- und PMA-induzierten Bindungen nicht beeinträchtigt wurden. Schon sehr frühe Daten zeigten, daß GPI-geankerte Moleküle einen Komplex mit *src*-Kinasen bilden (Cinek und Horejsi, 1992; Cerny et al, 1996). *Src*-Kinasen sind eine große Familie der Tyrosin-Kinasen. Speziell für CD24 wurde 1997 von Sammar et al gezeigt, daß es in monozytären ESb-MP-Zellen mit den *src*-Kinasen *hck*, *lck* und *lyn* assoziiert. In diesen Zellen kann durch Antikörper gegen CD24 Zellaggregation induziert werden, die durch das Integrin VLA-5 und L1 vermittelt wird. Diese Aggregation kann durch den Tyrosin-Kinase-Inhibitor Genistein vollständig inhibiert werden (Sammar et al, 1997). Die Inkubation der Zellen mit Antikörpern gegen CD24 führt zur Tyrosin-Phosphorylierung von *lck* und *fyn* (Sammar et al, 1997). In der vorliegenden Dissertation konnte dargelegt

werden, daß das Clustern der Rafts auf der Zelloberfläche, sowohl mit Antikörpern gegen CD24 als auch mit CTx, zur Tyrosin-Phosphorylierung eines kleinen Proteins in der Größe zwischen 16 und 18 kD führt. Diese Phosphorylierung konnte nicht beobachtet werden nach Aktivierung der Thymozyten mit Mg^{2+} /EGTA oder PMA. In verschiedenen T-Zell-Hybridomen und in einem T-Zell-Lymphom fand sich das Protein konstitutiv Tyrosin-phosphoryliert, nicht jedoch in monozytären Zelllinien. Leider gelang es bisher nicht, die Identität dieses kleinen Proteins aufzuklären. Alle Versuche der präparativen Aufreinigung schlugen fehl, da die Tyrosin-Phosphorylierung nicht stabil war. Ein Gedanke war, daß es sich bei dem Protein um VIP17 handeln könnte. VIP17 gehört zur Familie der Tetraspan-Proteine und ist fast identisch mit dem humanen MAL, einem Protein welches als Marker während der T-Zell-Maturation identifiziert wurde (Kim et al, 1995). In allen exprimierenden Zelltypen wurde VIP17 in den Rafts gefunden (Zacchetti et al, 1995; Kim et al, 1995, Martin-Belmonte et al, 1998). VIP17 ist in polarisierten Zellen in den apikalen Transport involviert (Cheong et al, 1999). Dr. Kwang Ho Cheong vom EMBL in Heidelberg stellte Antikörper gegen VIP17 zur Verfügung, die leider nicht Maus-reaktiv waren. Präzipitationsexperimente zeigten, daß es sich bei dem gefundenen kleinen Phosphoprotein auch nicht um eine Komponente des CD3/T-Zell-Rezeptor-Komplexes handelt. Sammar et al zeigten 1997, daß Antikörper gegen CD24 in ESb-MP-Zellen zur Tyrosin-Phosphorylierung eines kleinen Proteins führten, welches aufgrund seiner Größe pp18 getauft wurde. Dieses Protein assoziiert in verschiedenen hämatopoetischen Zellen mit CD24. Pp18 zeigte sich als spezifisch assoziiert mit CD24, es konnte nicht mit anderen GPI-geankerten Molekülen und nicht mit transmembranen Molekülen nachgewiesen werden (Krauss et al, unveröffentlichte Daten). Pp18 konnte in ESb-MP-Zellen sowohl in der Detergens-löslichen als auch in der - unlöslichen Phase nachgewiesen werden. Die Assoziation mit CD24 war abhängig vom eingesetzten Lösungsmittel. BOG, welches die Rafts in der Zellmembran zerstört, löste die Assoziation von pp18 mit CD24. Diese Beobachtung legten nahe, daß es sich bei pp18 um ein Raft-Protein handelt (Krauss et al, unveröffentlichte Daten). Das Protein konnte bislang nur charakterisiert werden, eine Identifizierung war auch hier nicht möglich. Evtl. handelt es sich bei dem damals untersuchten pp18 um das gleiche Protein, welches in Thymozyten nach Raft-Clustern Tyrosin-phosphoryliert wird. Klarheit hierüber kann aber nur eine Identifizierung der Proteine bringen.

In Jurkat-Zellen führt das Clustern der Rafts über G_{M1} oder GPI-geankerte Moleküle zu einer Aktivierung der *src*-Kinasen. Außerdem kommt es zu einer Akkumulation von filamentösem Aktin, welche abhängig von Tyrosin-Phosphorylierungen in den Rafts ist (Harder und

Simons, 1999). Die Studie geht davon aus, daß die Tyrosin-Phosphorylierungen vor der Rekrutierung der Aktin-Filamente geschehen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten, daß Genistein die durch Raft-Clustern induzierte Aktivierung von LFA-1 inhibiert, weisen daraufhin, daß das Zytoskelett eine kritische Rolle spielt. Die Tatsache, daß der Aktin-Stabilisator Jasplakinolide ebenfalls die durch Raft-Clustern induzierte Bindung der Thymozyten an ICAM-1 inhibiert, unterstützt diesen Aspekt.

4. Raft-Clustern involviert das Zytoskelett

Jasplakinolide stabilisiert existierende Aktin-Filamente, forciert die Aktinpolymerisation und beugt gleichzeitig der Depolymerisation bestehender Aktin-Filamente vor (Bubb et al, 1994). Jasplakinolide „fixiert“ die bestehenden Zytoskelett-Situation und verhindert Veränderungen. Eine Inkubation von Thymozyten mit diesem Agens sollte eine Regulation der Integrinaktivität, die Veränderungen des Zytoskeletts bedarf, vollständig unterbinden. Tatsächlich war eine Aktivierung der Thymozyten nach Inkubation mit Jasplakinolide durch Anti-CD24-Antikörper oder CTx nicht mehr möglich. Das Clustern der Rafts beinhaltet gleichzeitig Zytoskelett-Veränderungen. Auch die Aktivierung von LFA-1 durch den Phorbolster PMA war stark eingeschränkt. Diese Beobachtung korreliert mit Daten aus humanen T-Lymphozyten (Stewart et al, 1998). In dieser Studie wurde die Aktivierung von LFA-1 durch Ca^{2+} -mobilisierende Agenzien wie Ionomycin, Thapsigargin bzw. anderer Ereignisse, die einen Ca^{2+} -Einstrom zur Folge haben, nämlich der Vernetzung des T-Zell-Rezeptor-Komplexes oder der Aktivierung der Protein Kinase C (PKC) durch Phorbolster, untersucht. Es wurde beobachtet, daß jede dieser Aktivierungsarten, die auf einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen basieren, zu einer lokalen Konzentration des LFA-1-Integrins in der Zellmembran führen. Es kommt zu einer Aviditätserhöhung des Integrins, die im Gegensatz steht zur erhöhten Affinität durch die Gabe von Kationen (Stewart et al, 1998). Außerdem wurde in dieser Studie gezeigt, daß Jasplakinolide das Clustern des LFA-1-Integrins und somit auch die T-Zell-Adhäsion unterbinden konnte. Calpain, eine Ca^{2+} -abhängige Protease scheint stark involviert zu sein in den Prozeß des LFA-1-Clusterns. So konnten spezifische Inhibitoren für Calpain die LFA-1-vermittelte Bindung an ICAM-1 inhibieren (Stewart et al, 1998). Die Zielstruktur von Calpain ist bislang unbekannt. Leider war ein Einfluß von Calpain in dem hier verwendeten Thymozyten-System nicht nachweisbar, da verschiedene Inhibitoren für Calpain bzw. die zu verwendenden Lösungsmittel, auf die naiven, murinen T-Zellen toxisch wirkten. Es wurden die Inhibitoren Calpeptin und CBZ-LVG verwendet. Fazit der

Studie von Stewart et al ist, daß jedes zelluläre Ereignis, welches einen Ca^{2+} -Einstrom zur Folge hat, zum Clustern des LFA-1-Integrins auf der Zelloberfläche führt. Dies hätte in jedem Fall eine erhöhte Avidität zur Folge, welche sich in einem erhöhten Bindungsvermögen der Zellen an ICAM-1 widerspiegelt. In der vorliegenden Dissertation wurde ein solcher Einfluß von Ca^{2+} -mobilisierenden Substanzen nicht untersucht, es gibt aber verschiedene Studien, die einen Ca^{2+} -Einstrom, ausgelöst durch GPI-geankerte Moleküle in T-Lymphozyten, beschreiben (Stulnig et al, 1997; als Review siehe Robinson, 1991). Für CD24 ist beschrieben, daß es durch Antikörper-Vernetzung zum Ca^{2+} -Einstrom in Milz-B-Zell-Lymphoblasten (Fischer et al, 1990) und in neuronalen Zellen (Kadmon et al, 1995) kommt. Eine mögliche Verbindung zwischen Raft-Clustern durch CD24-Antikörper und einem Ca^{2+} -Einstrom ins Zellinnere ist also in Erwägung zu ziehen.

5. Affinität versus Avidität

In den letzten Jahren wurde die Regulation der Integrin-Aktivität sehr intensiv studiert. Die meiste Aufmerksamkeit wurde hierbei auf Konformationsänderungen gelegt, die mit einer erhöhten Integrinaffinität einhergehen. Erst in letzter Zeit wurde ein alternativer Weg, nämlich das lokale Clustern von Integrinen und damit eine erhöhte Avidität, in Betracht gezogen (Stewart et al, 1998; Bazzoni und Hemler, 1998; Yauch et al, 1997; Van Kooyk et al, 1999; Neeson et al, 2000). Für LFA-1 wurde gezeigt, daß sich der durch Kationen induzierte und der durch Phobolester induzierte Weg der Bindungserhöhung an ICAM-1 in Bezug auf den Gebrauch der sog. I-Domäne unterscheiden (McDowall et al, 1998). Die I-Domäne umfaßt eine Region von 200 Aminosäuren am Aminoterminalen Ende der α_L -Kette von LFA-1 und stellt ein zusätzliches Bindungsmotiv für den Liganden ICAM-1 dar (Landis et al, 1994; McDowall et al, 1998). Diese I-Domäne im LFA-1-Integrin wurde bezüglich der Bindungsvermittlung intensiv untersucht (Knorr und Dustin, 1997; Leitinger und Hogg, 2000; Huang et al, 2000; als Review siehe Leitinger und Hogg, 1999) und die Struktur bis ins Detail aufgeklärt (Zang et al, 2000; Huth et al, 2000; Huang et al, 2000). Van Kooyk et al machten 1999 deutlich, daß es sich bei der Aviditätsregulation ganz klar um einen eigenständigen Weg der Regulation der LFA-1-Aktivität handelt, bei dem in keiner Weise die Affinität für lösliches Substrat erhöht wird. In den gleichen Zellen sind aber beide Wege möglich. Für das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf Blutplättchen wurde gezeigt, daß die Affinitätsmodulation ein dominierender Regulator der Integrinaktivität ist, aber das Integrin-Clustern kann die Bindung noch zusätzlich verstärken (Hato et al, 1998). Demnach sind die Regulation der

Integrinaktivität durch Modulation der Avidität und durch Modulation der Affinität zwei Wege, die zwar getrennt voneinander reguliert werden, sich aber durchaus nicht ausschließen, sondern sich ergänzen können.

Dem bisher beschriebenen Weg der Modulation der Integrinaktivität durch Phorbolester kann nun der Weg des Raft-Clusters hinzugefügt werden.

6. Die physiologische Relevanz des Raft-Clusters in der Zelladhäsion

Als anfangs die Hypothese aufgestellt wurde, daß das Clustern der Rafts auf den Thymozyten unabdingbar das Clustern von LFA-1 zur Folge hat und somit die Integrinaktivität erhöht wird, wurden verschiedene Methoden eingesetzt, um die Integrität der Rafts zu zerstören und somit die Topologie der Zellmembran zu verändern. Rafts sind hochangereichert mit Cholesterin. Verschiedene Studien haben gezeigt, daß die Depletion des Cholesterins aus der Zellmembran die Rafts zerstört und ihre Funktionsfähigkeit somit unterbindet (Varma und Mayor, 1998; Friedrichson und Kurzchalia, 1998; Keller und Simons, 1998). Es wurden zwei Methoden angewandt, um das Cholesterin zu reduzieren. Einmal wurde das Cholesterin mittels Methyl- β -Cyclodextrin aus der Zellmembran extrahiert, und zum anderen wurde die Cholesterin-Neusynthese durch spezifische Inhibitoren unterbunden. Bei den Inhibitoren handelt es sich um Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase, die in einen sehr frühen Schritt der Cholesterinsynthese eingreifen. Abb. 55 skizziert die Cholesterin-Biosynthese in Säugetierzellen und zeigt den Angriffspunkt der Inhibitoren. Um die HMG-CoA-Reduktase zu inhibieren, wurden die Substanzen Lovastatin oder Pravastatin verwendet. Zunächst wurde der Effekt von Methyl- β -Cyclodextrin auf das Bindungsverhalten von Thymozyten an ICAM-1 ausgetestet. Nach Behandlung der Zellen mit 1 mM Methyl- β -Cyclodextrin waren die Zellen nicht mehr durch Raft-Clustern in der LFA-1-vermittelten Bindung aktivierbar. Auch der PMA-Weg war deutlich eingeschränkt. Dies zeigt, daß es durchaus eine Verflechtung der Wege zur Aviditätsregulation gibt, auch der PMA-induzierte Weg ist abhängig von der Integrität der Rafts. Die Affinitätsregulation über Kationen blieb unbeeinträchtigt. Bei aktivierten T-Zellen konnte das ebenfalls festgestellt werden.

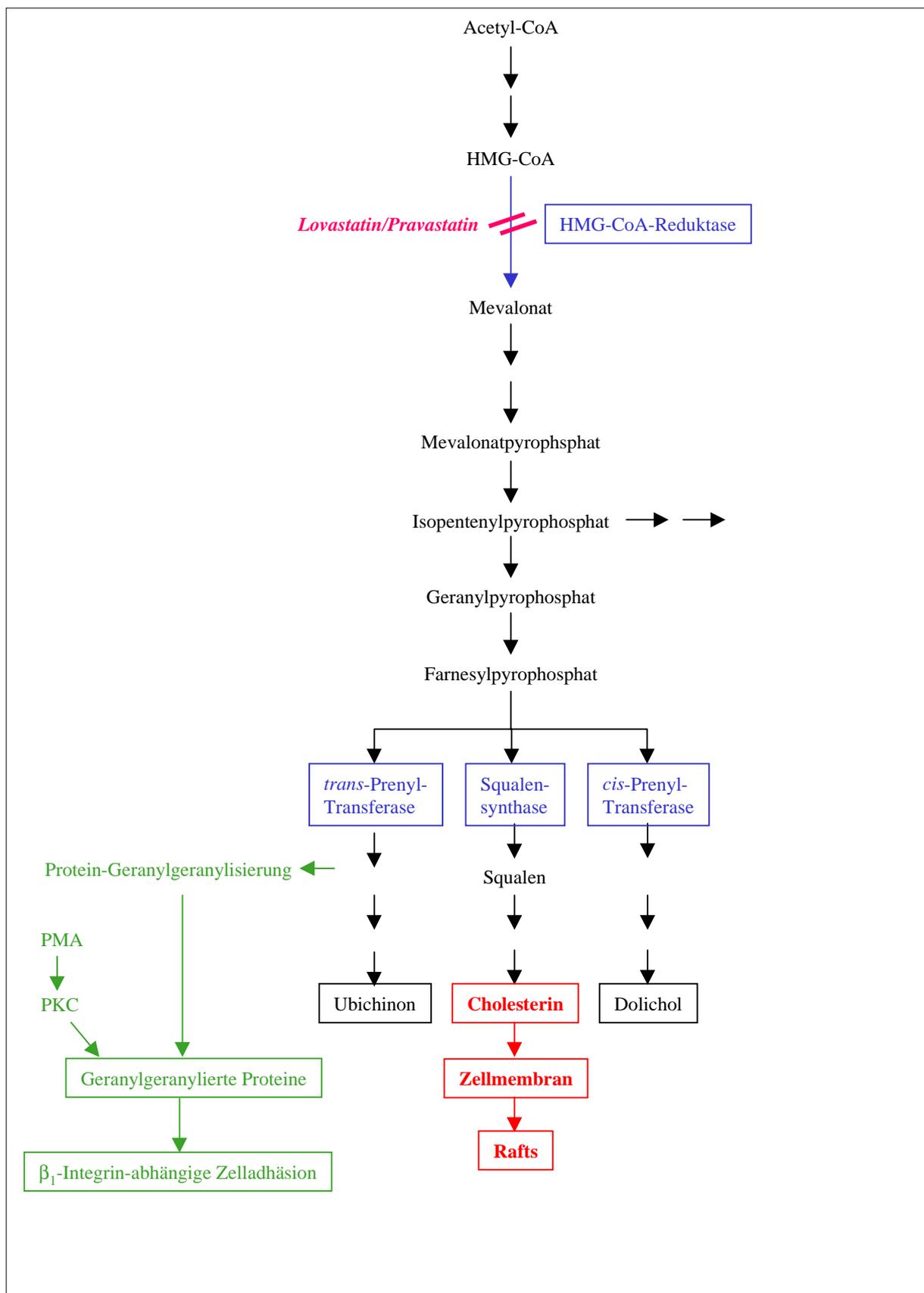


Abb. 55 skizziert den Weg der Cholesterin-Biosynthese. Enzyme sind blau gekennzeichnet. Grün ist der Weg dargestellt, der zu geranylgeranylierten Proteinen führt, die in die β_1 -Integrin-abhängige Zelladhäsion involviert sind.

Aktivierete T-Zellen verfügen über ein hochaktives LFA-1-Integrin und zeigen daher ein viel höheres basales Bindungsvermögen an ICAM-1 als Thymozyten (Abb. 25). Um eine mögliche physiologische Relevanz der Raft-Integrität auf dieses basale Bindungsvermögen zu untersuchen, wurden die Zellen mit Methyl- β -Cyclodextrin vorbehandelt und anschließend die Bindung an ICAM-1 untersucht. Die Aktivität von LFA-1 ließ sich mit zunehmender Konzentration von Methyl- β -Cyclodextrin zunehmend unterbinden. Die Tatsache, daß die Zellen über Kationen in der Bindung rekonstituiert werden konnten, belegt, daß die Cholesterin-Extraktion das Integrin per se nicht beeinflußt. Die gleichen Ergebnisse fanden sich nach Inkubation der Zellen mit dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Lovastatin. Allerdings sind die Daten aus den Experimenten mit Lovastatin kontrovers zu diskutieren. Wie im Schema (Abb. 55) deutlich zu sehen, greift Lovastatin sehr früh in die Cholesterin-Biosynthese ein. Zu diesem Zeitpunkt wird durch die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase auch gleichzeitig ein Weg unterbunden, der zur Protein-Geranylgeranylierung führt (Abb. 55, grün dargestellt). Geranylgeranylierte Proteine sind stark involviert in den PMA-induzierten Weg der Integrinaktivierung. Liu et al zeigten 1999, daß durch Behandlung von Jurkat- und U937-Zellen mit Lovastatin die β_1 -Integrinabhängige Zelladhäsion nach Aktivierung mit PMA unterbunden werden kann. Die Ergebnisse mit Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase können also nicht unkritisch gesehen werden. Zusammen mit den Ergebnissen aus den Experimenten mit Methyl- β -Cyclodextrin kann aber die Bedeutung der Raft-Integrität bei der Regulation der Integrinaktivität auf aktivierten T-Zellen postuliert werden. Der in dieser Dissertation vorgestellte Mechanismus der Integrinaktivierung durch Raft-Clustern zeigt im System der T-Zell-Aktivierung physiologische Relevanz.

Durch die große Mobilität der Rafts in der Zellmembran bietet sich ein sehr effizienter Weg, Zellbindung an Substrat zu initiieren. Der Adhäsion einer Zelle folgt meist die anschließende Migration auf einem Substrat bzw. die Transmigration durch das Gewebe. Dabei kommt es zunächst zur morphologischen Polarisation der Zelle (als Review siehe Lauffenburger und Horwitz, 1996). Diese Polarisation zeigt sich zunächst in einer lokalen Konzentration von Chemokin-Rezeptoren und Zelladhäsionsmolekülen am führenden Ende der Zelle, dem sog. „leading edge“. Rafts sind mit dem vesikulären Transport in den Zellen eng verbunden. Keller und Simons zeigten 1998, daß Cholesterin und die Rafts für den apikalen Transport unabdingbar sind. Die Rafts enthalten eine Vielzahl von GPI-geankerten Molekülen, darunter auch CD24. Der GPI-Anker ist schon seit langem als ein Signal für apikales Sorting in polarisierten Zellen identifiziert (Brown et al, 1989; Lisanti et al, 1989; Harder und Simons, 1997; Muniz und Riezman, 2000). Es ist denkbar, daß die Assoziation von Integrinen mit den

Rafts einen sehr effektiven Weg bietet, die Zelladhäsionsmoleküle während der Zellmigration sehr schnell und effizient zu verteilen. Die Morphologie der Zelle ist während der Zellmigration in ständiger Veränderung. Zunächst bildet sich der „leading edge“ aus, an dem sich Chemokin-Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle konzentrieren. Die Zelle wandert forciert durch Kontraktionskräfte über diese Adhäsionsmoleküle hinweg, die sich zum Abschluß eines solchen Migrationszykluses am Ende der Zelle befinden. Die Adhäsion muß nun wieder gelöst werden, bevor der nächste Migrationszyklus beginnen kann (Lauffenburger und Horwitz, 1996). Abb. 56 zeigt schematisch die morphologischen Veränderungen einer Zelle während der Migration auf. In rot sind die Rafts dargestellt, in denen nach eigenen Experimenten auch die Integrine lokalisiert sind. Die Integrin-Moleküle zirkulieren während der Migration vom „leading edge“ zum hinteren Ende der Zelle, von wo sie wiederum nach vorne gebracht werden (Sanchez et al, 1999). Die Membran-Mikrodomänen bieten ein wunderbares Werkzeug zur effizienten Verteilung der Moleküle. Kürzlich wurde die Beobachtung gemacht, daß Rafts entscheidend an der Polarisation der Zelle zu Beginn der Migration beteiligt sind (Manes et al, 1999). Zu diesem Zeitpunkt formieren sich, wie oben erwähnt, die Chemokin-Rezeptoren am „leading edge“ der Zelle. In MCF-7-Zellen ließ sich durch Zerstörung der Rafts mit Methyl- β -Cyclodextrin die Ausbildung von Filopodien verhindern und die Transmigration blockieren (Manes et al, 1999).

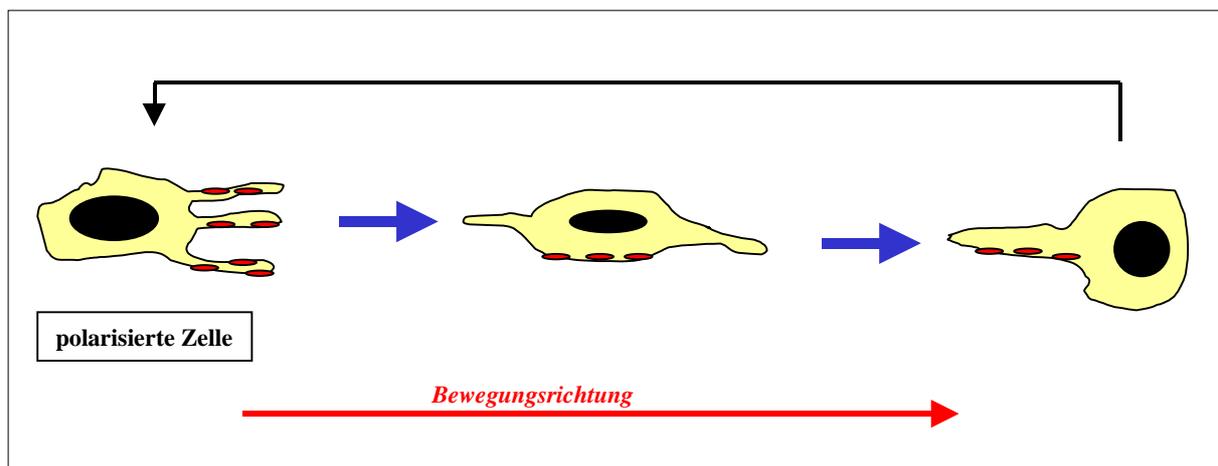


Abb. 56 Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen während der Zellmigration. Zunächst bilden sich am „leading edge“ Fortsätze aus, in denen verschiedene Chemokin-Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle konzentriert sind. Durch kontraktile Kräfte wandert die Zelle über den „leading edge“ hinweg nach vorne. Zum Ende des Migrationszyklus befinden sich die Adhäsionsmoleküle am hinteren Ende der Zelle, von wo sie wieder nach vorne gebracht werden. Der Zyklus kann von neuem beginnen.

Anfangs wurden die Rafts hauptsächlich mit Signaling- und Aktivierungsmechanismen und intrazellulärem Sorting von Molekülen in Verbindung gebracht (Brown und London, 1998). Eine wichtige Rolle wurde ihnen bei der T-Zell-Aktivierung zugesprochen (als Review siehe Janes et al, 2000). Hier wurde auch erstmals die Rolle der Rafts bei der Ausbildung der immunologischen Synapse bei T-Zell-APC-Kontakt erkannt (Viola et al, 1999). Die Rafts dienen der Konzentration kostimulatorischer Moleküle. Erstmals wurde klar, daß Rafts nicht nur für den intrazellulären Transport von entscheidender Bedeutung sind, sondern auch essentiell für die Verteilung von Molekülen auf der Zelloberfläche.

7. Die Rolle von CD24 bei der Regulation der Integrinaktivität

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, daß die Rafts eine essentielle Rolle bei der Regulation der Integrinaktivität spielen. Die Avidität von Integrinen kann durch das Clustern von Membran-Mikrodomänen so stark erhöht werden, daß Zellbindung an Substrat möglich wird. In den durchgeführten Experimenten wurden die Rafts artifiziell geclustert, entweder durch Antikörper gegen das GPI-geankerte Molekül CD24 oder durch CTx. Das Beispiel der aktivierten T-Zellen macht deutlich, daß die Regulation der Integrin-Aktivität durch Raft-Clustern auch physiologisch, ohne externe Einflüsse, stattfindet. Das Clustern der Rafts wird hier wahrscheinlich durch homo- oder heterophile Bindung von Molekülen induziert. Bei den Molekülen müßte es sich um Antigene handeln, die in den Rafts lokalisieren. Eine Bindung zwischen den Molekülen selbst bzw. mit einem spezifischen Liganden könnte zur Ausbildung von Raft-Clustern führen, die durch die Bindung stabilisiert wird. Ein möglicher Kandidat, der durch solche Bindungen zur Formation von großen Raft-Clustern führen könnte wäre CD24. CD24 ist ein typisches Raft-Molekül, es konnte auch als solches in der Detergens-unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden. Ein früherer Befund zeigt, daß CD24 aufgrund seiner starken Glykosylierung eine ausgeprägte Tendenz zur Selbstbindung aufweist (Kadmon et al, 1992). Außerdem vermag es an das C-Typ Lektin P-Selektin zu binden (Sammar et al, 1994, Aigner et al, 1995), dies gilt nicht nur für das murine CD24, sondern auch für das humane Homolog (Aigner et al, 1997; Aigner et al, 1998). Weitere Liganden für CD24 sind durchaus denkbar, konnten bislang aber nicht nachgewiesen werden. Für CD24 konnte schon sehr früh ein Zusammenhang mit der Aktivität von Integrinen nachgewiesen werden. Neben Daten, die eine Integrin-Aktivierung durch Antikörper gegen CD24 zeigen (Ruppert et al, 1995) liegen Ergebnisse vor, die einen Einfluß der Anwesenheit von CD24 auf der Zelloberfläche auf die Aktivität von α_4 -Integrinen zeigen

(Hahne et al, 1994; Kilger et al, 1995). Diese Daten beschreiben, daß CD24-defiziente präB-Zelllinien nur sehr gering an das α_4 -Substrat FN40 binden können. Die Bindung kann durch Transfektion der Zellen mit CD24-cDNA vollständig rekonstituiert werden. Kilger et al (1995) analysierten diese Bindungsunterschiede bezüglich der Bindung an das α_4 -Substrat VCAM. Hierbei wurde gezeigt, daß die α_4 -spezifische Bindung differentiell für die einzelnen Domänen von VCAM reguliert wird (Kilger et al, 1995). Außerordentlich interessant ist der Aspekt, daß in dem untersuchten Zellsystem die alleinige An- oder Abwesenheit von CD24 zur Regulation des α_4 -Integrins beiträgt. Peter Nielsen vom Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg stellte uns die in den oben genannten Studien verwendeten präB-Zelllinien und die CD24 k.o.-Mäuse, aus denen die Linien generiert wurden, zur Verfügung. Wir waren also im Besitz der CD24-defizienten Zelllinie N232.18 und der stabil mit CD24-transfizierten Zelllinie 18H18. Mit diesen Zellen wurden Bindungsversuche auf dem α_4 -Substrat FN40 unternommen. Die CD24^{+/+} Zellen banden deutlich besser an FN40 als die CD24^{-/-} Zellen. Sowohl die starke Bindung der CD24^{+/+} Zellen als auch die geringe Bindung der CD24^{-/-} Zellen konnte durch Antikörper gegen α_4 inhibiert werden. Die Expressionsdichte des Integrins ist auf beiden Zellen gleich. Bei dem beobachteten Defekt in der Bindungsfähigkeit könnte es sich um ein Phänomen handeln, das nur bei dem Klon N232.18 auftritt. Um dies auszuschließen wurden aus der Linie 18H18 Revertanten sortiert und angereichert, die CD24 wieder verloren hatten. Auch diese Revertanten banden deutlich schlechter als die CD24^{+/+} 18H18. Weitere Untersuchungen zeigten, daß nach Aktivierung der Integrine mit PMA sowohl CD24^{-/-} als auch CD24^{+/+} Zellen ein ähnliches Bindungsvermögen an FN40 zeigen. Ein genereller Defekt des Integrins konnte somit ausgeschlossen werden. Die Unterschiede zwischen den CD24^{+/+} und CD24^{-/-} Zellen fanden sich nicht nur in der statischen Adhäsion, sondern konnten auch in Transmigrationsversuchen nachgewiesen werden. Hier sollte untersucht werden, ob es sich bei dem beobachteten Defekt um eine Eigenschaft der beiden Zelllinien handelt, oder ob er genereller Natur ist. Dazu wurden Whitlock-Witte Knochenmarkskulturen von normalen und CD24 k.o.-Mäusen angelegt und nach drei Wochen für Transmigrationsversuche herangezogen. Schon bei der Präparation der Knochenmarkszellen machten sich Unterschiede zwischen den CD24^{-/-} und den CD24^{+/+} Mäusen bemerkbar: Die CD24^{-/-} Tiere besaßen deutlich mehr Zellen im Knochenmark als die CD24^{+/+} Tiere. In funktionellen Versuchen zeigten die präB-Zellen sowohl in der statischen Adhäsion als auch in der Migration auf dem α_4 -Substrat FN40 deutliche Unterschiede in der Funktionalität des α_4 -Integrins, die nur abhängig war von der Expression von CD24 auf der Zelloberfläche. Es stellte sich die Frage, in wie weit die Rafts

mit diesem Phänomen in Verbindung zu bringen sind. Sowohl biochemische als auch fluoreszenzmikroskopische Analysen zeigten, daß auch in diesen Zellen CD24 und das α_4 -Integrin z. T. in den Rafts lokalisieren. Durch Antikörper gegen CD24, die zu einem Clustern der Rafts führen, konnte die ohnehin schon gute Bindung der CD24^{+/+} Zellen noch deutlich verstärkt werden. Eine Zerstörung der Rafts durch Cholesterin-Depletion inhibierte die Bindung der CD24^{+/+} Zellen an FN40. Die Rafts spielen also bei der Bindung der CD24^{+/+} Zellen eine entscheidende Rolle.

GPI-geankerte Moleküle wie CD24 lagern sich aufgrund des lipophilen GPI-Ankers sehr leicht in die Membran ein und können daher passiv von den Zellen aufgenommen werden. Tatsächlich zeigt sich nach Inkubation der CD24^{-/-} Zellen mit affinitätschromatographisch aufgereinigtem, löslichem CD24 eine deutliche Aufnahme des Moleküls in der FACS-Analyse. Das Bindungsvermögen der Zellen an FN40 ließ sich im gleichen Maße erhöhen, wie CD24 in die Zellen aufgenommen wurde. Durch Cholesterin-Depletion konnte dieser Effekt wieder rückgängig gemacht werden, wobei aber die Menge von CD24 auf der Zelloberfläche gleich blieb. Die Restauration des Bindungsvermögens durch externe Gabe von löslichem CD24 ist also abhängig von dessen spezifischem Einbau in die Rafts der Zellmembran. CD24 ist hochangereichert in den Rafts der CD24^{+/+} Zellen, eine Restauration des Bindungsvermögens sollte also auch möglich sein, indem man die CD24^{-/-} Zellen mit der Detergens-unlöslichen Fraktion von CD24^{+/+} Zellen und CD24^{-/-} Zellen inkubiert. Tatsächlich ließ sich das Bindungsvermögen nach Inkubation mit der DIG-Fraktion aus CD24^{+/+} Zellen wiederherstellen. Wie die FACS-Analyse zeigte, wurde CD24 von den Zellen aufgenommen, die Expression anderer Moleküle wie dem α_4 -Integrin selbst oder dem Gangliosid G_{M1} blieb unverändert. Dennoch mußte ein zusätzlicher Beweis erbracht werden, daß die Wiederherstellung des Bindungsvermögens spezifisch für die Aufnahme von CD24 aus der Detergens-unlöslichen Fraktion war und nicht bedingt wurde durch Parameter, die im FACS nicht überprüft werden konnten. Benötigt wurde ein vollkommen unabhängiges GPI-geankertes Molekül. Dr. Patrick Keller vom EMBL in Heidelberg stellte ein GPI-geankertes gelb-fluoreszierendes Protein (YFP-GPI) zur Verfügung. Die DNA des Proteins lag in einem adenoviralem Vektor vor und die CD24^{-/-} Zellen wurden damit infiziert, worauf das YFP-GPI exprimiert und in den Rafts der Zellen angereichert wurde. Anschließend wurden wiederum CD24^{-/-} Zellen mit der DIG-Fraktion dieser infizierten Zellen inkubiert und im Bindungsversuch analysiert. Durch die Inkubation mit der DIG-Fraktion änderte sich das Bindungsverhalten der CD24^{-/-} Zellen in keiner Weise. Diese Experimente machten deutlich,

daß die Regulation des α_4 -Integrins spezifisch beeinflusst wird durch CD24 und geben einen Hinweis darauf, daß evtl. der extrazelluläre Teil von CD24 eine entscheidende Rolle spielt. Versuche, bei denen CD24 mittels der Phosphoinositol-spezifischen Phospholipase C von der Zelloberfläche abgeschnitten wurde, wiesen ebenfalls in diese Richtung. CD24 ist ein sehr stark glykosyliertes Molekül (Alterman et al, 1990). In lymphoiden Zellen kommt es in verschiedenen Glykosylierungsformen vor (Kay et al, 1990; Wenger et al, 1991; Alterman et al, 1990). Um den Einfluß verschiedener Glykosylierungsformen auf das Bindungsverhalten der präB-Zellen an FN40 zu testen, wurden aus verschiedenen hämatopoetischen Zellen DIG-Fraktionen isoliert und die CD24^{-/-} Zellen vor dem Bindungsversuch inkubiert. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Klarheit über den Einfluß der Art der Glykosylierung sollen Experimente bringen, bei denen Glykosylierungsmutanten von CD24 in den Zellen exprimiert werden. Die Glykosylierungsmutanten wurden uns von Dr. Peter Nielsen bereits zur Verfügung gestellt, allerdings gelang bisher noch keine Transfektion der Zellen.

Nicht nur der Einfluß des extrazellulären Teiles von CD24 soll näher untersucht werden, sondern ein besonderes Augenmerk soll auf den Einfluß der Verankerung des Moleküls gelenkt werden. Hierzu wurden bereits CD24-Konstrukte hergestellt, bei denen der GPI-Anker durch den transmembranen Teil von L1 bzw. L-Selektin ersetzt wurde. Die Konstrukte konnten bereits erfolgreich in Cos-7- und CHO-Zellen exprimiert werden, eine Transfektion der CD24^{-/-} präB-Zellen gelang bisher nicht. Da sich die Zellen sehr schlecht transfizieren lassen, soll auf das adenovirale System gewechselt werden, mit dem es schon gelang, das YFP-GPI in die Zellen einzuschleußen.

Bislang kann der Einfluß der CD24-Expression auf der Zelloberfläche auf die Regulation der Aktivität des α_4 -Integrins nur phänomenologisch beschrieben werden. Es konnte aufgezeigt werden, daß CD24 nicht nur in die statische Adhäsion, sondern auch in die dynamische Migration eingreift. Entscheidend dabei ist die Lokalisation von CD24 und α_4 in den Membran-Mikrodomänen der Zelle. Die Regulation der α_4 -Aktivität ist hochspezifisch für CD24, welcher Teil des Moleküls dies ausmacht, konnte bislang nicht hinreichend geklärt werden.

Verschiedene Aspekte für den Einfluß von CD24 können diskutiert werden. CD24 zeigt eine starke Tendenz zur Selbstbindung (Kadmon et al, 1992). Durch dieses Selbstbindungsvermögen könnte CD24 in Rafts eine homophile cis-Interaktion herbeiführen und somit zum Clustern der Rafts führen. Dies hätte das Ko-Clustern von α_4 und somit eine

erhöhte Avidität zur Folge. Das gleiche kann natürlich passieren durch Bindung von CD24 an einen Liganden, eine trans-Interaktion. Als Ligand für CD24 ist P-Selektin beschrieben (Sammar, 1994; Aigner 1997). Allerdings muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß es noch weitere Liganden für CD24 gibt. Da P-Selektin auf präB-Zellen nicht exprimiert wird, müßte im Falle einer heterophilen Bindung von CD24 ein Ligand auf der Zelle identifiziert werden. Der Ligand für CD24 muß nicht zwangsläufig auf der Zelle lokalisieren, es könnte sich auch um einen löslichen Liganden handeln. Ein ähnliches Phänomen wurde für die Bindung von Chemokinen an spezifische Rezeptoren beschrieben. Chemokine binden transmembrane Rezeptoren auf der Oberfläche von Leukozyten, die mit G-Proteinen assoziieren und sehr schnell die Aktivität von Integrinen erhöhen können (Bargatze und Butcher, 1993; Campbell, et al, 1996; Lawrence und Springer, 1991; Peled et al, 1999). Dadurch wird z. B. die Bindung von im Blutstrom zirkulierenden Lymphozyten an das Endothel vermittelt (Campbell et al, 1996; Peled et al, 1999; Grabovski et al, 2000). Chemokin-Rezeptoren können in den Rafts lokalisieren, und die Integrität der Rafts ist essentiell für den Prozeß der Zellmigration (Manes et al, 1999). Bei der Erhöhung der Aktivität von Integrinen nach Bindung von Chemokinen durch die Zellen, handelt es sich nicht um eine Affinitätsregulation, die Avidität der Integrine wird erhöht (Grabovsky et al, 2000). Obwohl die Signalwege, die durch die Bindung der Chemokine induziert werden, weder die PI3-Kinase noch Ca^{2+} -abhängige Wege involvieren (Ganju et al, 1998; Sanchez-Madrid und del Pozo, 1999; Mannion et al, 1999), korrelieren sie doch stark mit den Ereignissen, die nach dem Clustern der Rafts geschehen. Es kommt zu Tyrosin-Phosphorylierungen und extremen Zytoskelett-Veränderungen (Bacon et al, 1996; Davis et al, 1997, Ganju et al, 1998; Li et al, 1998). Zusammengefaßt sprechen alle diese Daten für eine Rolle des Raft-Clusterns bei der Integrin-Aktivierung nach Bindung von Chemokinen. Die Rolle von GPI-geankerten Molekülen wie CD24 als Raft-Marker beim Clustern der Rafts ist unbestritten (s.o.). CD24 könnte also auch durch Bindung eines löslichen Liganden Einfluß auf die Regulation der Integrin-Aktivität erlangen. Abb. 57 faßt nochmals die genannten Möglichkeiten zusammen, wie ausgehend von CD24 die Rafts geclustert werden könnten.

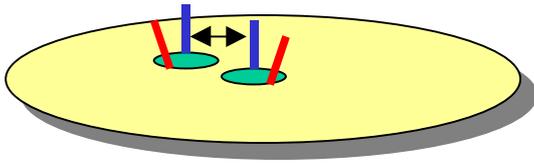
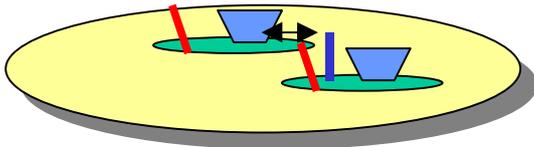
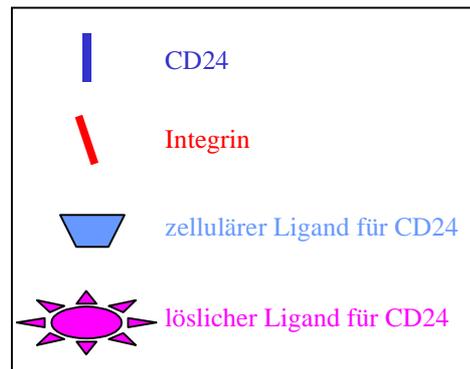
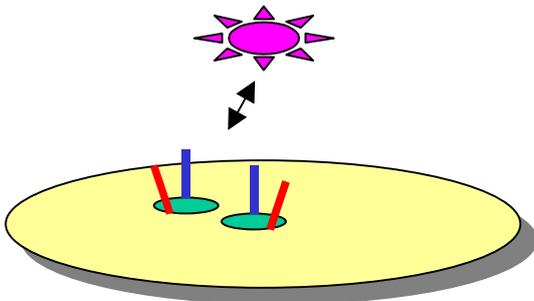
1) *Homophile Bindung von CD24 in cis*2) *Heterophile Bindung von CD24 an einen zellulären Liganden in cis*3) *Heterophile Bindung von CD24 an einen löslichen Liganden in trans*

Abb. 57 Initiation und Stabilisation von Raft-Clustern über CD24 durch Ausbildung von cis-Interaktionen durch 1) homophile Bindungen oder 2) heterophile Bindung an einen zellulären Liganden oder von trans-Interaktionen durch 3) heterophile Bindung an einen evtl. löslichen Liganden .

Die bisher vorgestellten Ansätze gehen davon aus, daß CD24 Initiator des Clusters von Rafts auf der Zelloberfläche ist. Natürlich kann die Initiative zum Clustern der Rafts auch von anderen Molekülen ausgehen und CD24 möglicherweise nur ein Stabilisator der gebildeten Raft-Cluster sein.

Eine Modulation der Integrin-Aktivität durch laterale Assoziation mit anderen Molekülen wird in letzter Zeit stark diskutiert (Woods und Couchman, 2000). Hier sind vor allem Moleküle der Tetraspan-Familie (TM4SF) und Proteoglykane zu nennen. Es wurde gezeigt, daß die Tetraspans mit Integrinen in Clustern lokalisieren, vor allem am „leading edge“ der Zelle während der Zellmigration (Tachibana et al, 1997; Berditchevski et al, 1995 und 1997). Zelloberflächen-Proteoglykane sind in der Lage, sowohl Zelladhäsion als auch Zellmigration zu beeinflussen (Bernfield et al, 1999; Rapraeger et al, 1998). Syndekane können auch in Assoziation mit Integrinen stehen, allerdings nicht direkt, sondern in Verbindung mit TM4SF-Molekülen (Jones et al, 1996). Für Integrine gibt es demnach variable Möglichkeiten, lateral mit anderen Membrankomponenten zu assoziieren. Ein weiterer Aspekt wäre, daß CD24 selbst an Integrine bindet und es somit zur Cluster-Formation kommt. CD24 könnte im Zuge der lateralen Assoziation auf zwei Arten relevant sein: entweder stabilisiert CD24 ein durch Integrine initiiertes Clustern der Rafts durch homophile oder heterophile Bindung, oder es interagiert selbst mit Integrinen und initiiert die Cluster-Formation.

Das α_4 -Integrin assoziiert nicht nur lateral auf der Zelloberfläche mit anderen Molekülen; über die Assoziation mit Paxilin konnte eine direkte Verbindung mit dem Zytoskelett nachgewiesen werden (Liu und Ginsberg, 2000). Diese Verbindung kann zur Modulation Integrin-abhängiger Prozesse in der Zelle führen (Liu et al, 1999). Im T-Zell-System konnte eine Beteiligung des Zytoskelett beim Clustern der Rafts eindeutig nachgewiesen werden (vorliegende Dissertation), so daß möglicherweise ein Clustern der Rafts auch direkt vom Zytoskelett ausgehen kann. Hierbei fände CD24 wieder seine Rolle als Stabilisator der Cluster.

Ein wichtiger Aspekt ist die Mobilität von Molekülen auf der Zelloberfläche. Eine neue Studie zeigt, daß die Diffusionsgeschwindigkeit von Molekülen in der Zellmembran in direkter Abhängigkeit steht mit der Lokalisation in Rafts (Pralle et al, 2000). Raft-assoziierte Moleküle diffundieren langsamer, durch Cholesterin-Depletion kann die Geschwindigkeit erhöht werden. Dabei ist die Größe der Rafts ein entscheidender Faktor. Möglicherweise involviert die Regulation der α_4 -Integrin-Aktivität durch CD24 eine Veränderung der Mobilität des Integrins in der Zellmembran.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß alle Überlegungen zur Funktion von CD24 bisher nur spekulativ sind. Definitiv festzuhalten bleibt der starke Einfluß, den CD24 als Raft-Molekül auf die α_4 -vermittelte Bindung im präB-Zell-System hat. CD24 k.o. Mäuse zeigen einen milden Block in der B-Zell-Differenzierung im Knochenmark (Nielsen et al, 1997). Eine ähnliche Blockade, wenn auch in viel stärkerer Form, wurde kürzlich für α_4 -defiziente B-

Lymphozyten beschrieben (Arroyo et al, 1996; Arroyo et al, 1999). Diese Mäuse entwickeln normale T-Zellen, die Differenzierung des B-Zellkompartiments ist allerdings gestört. Möglicherweise bedeutet diese Ähnlichkeit im Phänotyp, daß bei den CD24 k.o. Mäusen in Wahrheit eine Störung der α_4 -Funktion vorliegt. Die Rolle von CD24 bei der Regulation des Integrins wäre demnach von entscheidender Bedeutung.

8. Ausblick

Die Rolle der Rafts bei der Regulation der Zelladhäsion konnte eindeutig belegt werden, das gleiche gilt für die physiologische Relevanz im T-Zell-System. Die Rolle von CD24 als Raft – Protein bleibt zunächst unklar, der immense Einfluß von CD24 auf die α_4 -abhängige Bindung ist unbestritten. Studien mit Glykosylierungsmutanten und mit den transmembranen Konstrukten von CD24 sollen einen Einblick geben über die Teile von CD24, die involviert sind. Fluoreszenzmikroskopische Analysen sollen die Mobilität des α_4 -Integrins in CD24+/+ und CD24-/- Zellen miteinander vergleichen. Desweiteren sollte eine direkte Assoziation des Integrins mit CD24 untersucht werden. Interessant wäre auch die Suche nach einem neuen Liganden für CD24, der möglicherweise auch ein Raft-Molekül ist.

E. Zusammenfassung

Rafts sind Mikrodomänen in der Zellmembran, die stark angereichert sind mit Sphingolipiden, Cholesterin, signaltransduzierenden Molekülen, GPI-geankerten Proteinen und einigen transmembranen Molekülen. Rafts spielen eine wichtige Rolle in der T-Zell-Funktionalität.

In der vorliegenden Dissertation wurde die Rolle der Rafts bei der Regulation der Zelladhäsion untersucht. Ausgehend von der Integrinaktivierung über das GPI-geankerte Molekül CD24 wurde ein genereller Mechanismus zur Regulation der Aktivität des Leukozyten-Funktions-Antigens-1 (LFA-1) in T-Lymphozyten aufgeklärt. Es konnte gezeigt werden, daß Antikörper gegen das GPI-geankerte Molekül CD24 eine Aktivierung des LFA-1-Integrins zu induzieren vermögen. Diese Aktivierung hängt ab von der Kollokalisierung des Integrins mit CD24 in den Rafts der Zellmembran und ist bedingt durch eine Vernetzung der Rafts, was zu einer Erhöhung der Avidität des Integrins führt. Das Vernetzen des Raft-Markers G_{M1} kann die Avidität in gleicher Weise erhöhen. In den o. g. Aktivierungsmechanismus sind die PI3-Kinase, Tyrosin-Kinasen und das Zytoskelett involviert. Cholesterin-Depletion inhibiert den Aktivierungsmechanismus des LFA-1 über Raft-Clustern. Eine physiologische Relevanz des vorgestellten Aktivierungsmechanismus konnte für aktivierte T-Zellen gezeigt werden. Durch Cholesterin-Depletion kann das basale Bindungsvermögen der Zellen reduziert werden.

Die Rolle von CD24 als Raft-Molekül wurde bei der Regulation des α_4 -Integrin in prä-B-Lymphozyten untersucht. In diesem System führte die Anwesenheit von CD24 auf der Zelloberfläche zur erhöhten Bindung an ein α_4 -Integrin-Substrat. Auch in diesen Zellen ist CD24 und das α_4 -Integrin z. T. in den Rafts lokalisiert. Der in T-Lymphozyten nachgewiesene Aktivierungsweg des Integrins durch Clustern der Rafts ist auch hier aktiv. Ein Einfluß von CD24 auf die Aktivität des α_4 -Integrins konnte auch in der α_4 -abhängigen Migration gezeigt werden. In CD24-negativen Zellen konnte durch externe Gabe von löslichem CD24 die α_4 -vermittelte Bindung rekonstituiert werden. Der Effekt kann durch Cholesterin-Depletion wieder aufgehoben werden. Der gleiche Effekt gilt für die Inkubation der Zellen mit DIG-Fraktionen, die CD24 enthielten. Der Effekt war spezifisch für CD24 und wurde nicht mit GPI-geankerten Kontrollmolekülen beobachtet. PI-PLC-Behandlung von CD24-positiven Zellen reduziert die α_4 -vermittelte Bindung. Die Ergebnisse werden im Sinne einer Funktion des CD24 bei der Stabilisierung von Raft-Clustern in der Membran diskutiert.

F. Literatur

- Ahmed, S. N., D. A. Brown, et al. (1997). "On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes." Biochemistry **36**(36): 10944-53.
- Aigner, S., C. L. Ramos, et al. (1998). "CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin." Faseb J **12**(12): 1241-51.
- Aigner, S., M. Ruppert, et al. (1995). "Heat stable antigen (mouse CD24) supports myeloid cell binding to endothelial and platelet P-selectin." Int Immunol **7**(10): 1557-65.
- Aigner, S., Z. M. Sthoeger, et al. (1997). "CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells." Blood **89**(9): 3385-95.
- Akashi, T., T. Shirasawa, et al. (1994). "Gene expression of CD24 core polypeptide molecule in normal rat tissues and human tumor cell lines." Virchows Arch **425**(4): 399-406.
- Alterman, L. A., I. N. Crispe, et al. (1990). "Characterization of the murine heat-stable antigen: an hemolymphoid differentiation antigen defined by the J11d, M1/69 and B2A2 antibodies." Eur J Immunol **20**(7): 1597-602.
- Altevogt, P., M. Hubbe, et al. (1995). "The alpha 4 integrin chain is a ligand for alpha 4 beta 7 and alpha 4 beta 1." J Exp Med **182**(2): 345-55.
- Altevogt, P., M. Michaelis, et al. (1989). "Identical forms of the CD2 antigen expressed by mouse T and B lymphocytes." Eur J Immunol **19**(8): 1509-12.
- Anderson, R. G. (1998). "The caveolae membrane system." Annu Rev Biochem **67**: 199-225
- Arroyo, A. G., J. T. Yang, et al. (1996). "Differential requirements for alpha4 integrins during fetal and adult hematopoiesis." Cell **85**(7): 997-1008.
- Arroyo, A. G., J. T. Yang, et al. (1999). "Alpha4 integrins regulate the proliferation/differentiation balance of multilineage hematopoietic progenitors in vivo." Immunity **11**(5): 555-66.
- Bacon, K. B., M. C. Szabo, et al. (1996). "RANTES induces tyrosine kinase activity of stably complexed p125FAK and ZAP-70 in human T cells." J Exp Med **184**(3): 873-82.
- Bargatze, R. F. and E. C. Butcher (1993). "Rapid G protein-regulated activation event involved in lymphocyte binding to high endothelial venules." J Exp Med **178**(1): 367-72.
- Bargatze, R. F., N. W. Wu, et al. (1987). "High endothelial venule binding as a predictor of the dissemination of passaged murine lymphomas." J Exp Med **166**(4): 1125-31.

-
- Bazzoni, G. and M. E. Hemler (1998). "Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized?" Trends Biochem Sci **23**(1): 30-4.
- Benting, J., A. Rietveld, et al. (1999). "Acyl and alkyl chain length of GPI-anchors is critical for raft association in vitro." FEBS Lett **462**(1-2): 47-50.
- Benting, J. H., A. G. Rietveld, et al. (1999). "N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells." J Cell Biol **146**(2): 313-20.
- Berditchevski, F., G. Bazzoni, et al. (1995). "Specific association of CD63 with the VLA-3 and VLA-6 integrins." J Biol Chem **270**(30): 17784-90.
- Berditchevski, F., K. F. Tolia, et al. (1997). "A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase." J Biol Chem **272**(5): 2595-8.
- Bergelson, J. M. and M. E. Hemler (1995). "Integrin-ligand binding. Do integrins use a 'MIDAS touch' to grasp an Asp?" Curr Biol **5**(6): 615-7.
- Bernfield, M., M. Gotte, et al. (1999). "Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans." Annu Rev Biochem **68**: 729-77.
- Brown, D. (1993). "The tyrosine kinase connection: how GPI-anchored proteins activate T cells." Curr Opin Immunol **5**(3): 349-54.
- Brown, D. A. (1992). "Interactions between GPI-anchored proteins and membrane lipids." Trends Cell Biol **2**: 349-352.
- Brown, D. A., B. Crise, et al. (1989). "Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells." Science **245**(4925): 1499-501
- Brown, D. A. and E. London (1998). "Functions of lipid rafts in biological membranes." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 111-36.
- Brown, D. A. and E. London (2000). "Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts." J Biol Chem **275**(23): 17221-4.
- Brown, D. A. and J. K. Rose (1992). "Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface." Cell **68**(3): 533-44.
- Bruce, J., F. W. Symington, et al. (1981). "A monoclonal antibody discriminating between subsets of T and B cells." J Immunol **127**(6): 2496-501.
- Bruckner, K., J. Pablo Labrador, et al. (1999). "EphrinB ligands recruit GRIP family PDZ adaptor proteins into raft membrane microdomains." Neuron **22**(3): 511-24.
- Bubb, M. R., A. M. Senderowicz, et al. (1994). "Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin." J Biol Chem **269**(21): 14869-71.

-
- Campbell, J. J., J. Hedrick, et al. (1998). "Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions." Science **279**(5349): 381-4.
- Campbell, J. J., S. Qin, et al. (1996). "Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells." J Cell Biol **134**(1): 255-66.
- Cebecauer, M., J. Cerny, et al. (1998). "Incorporation of leucocyte GPI-anchored proteins and protein tyrosine kinases into lipid-rich membrane domains of COS-7 cells." Biochem Biophys Res Commun **243**(3): 706-10.
- Cerneus, D. P., E. Ueffing, et al. (1993). "Detergent insolubility of alkaline phosphatase during biosynthetic transport and endocytosis. Role of cholesterol." J Biol Chem **268**(5): 3150-5.
- Cerny, J., H. Stockinger, et al. (1996). "Noncovalent associations of T lymphocyte surface proteins." Eur J Immunol **26**(10): 2335-43.
- Chapman, H. A., Y. Wei, et al. (1999). "Role of urokinase receptor and caveolin in regulation of integrin signaling." Thromb Haemost **82**(2): 291-7.
- Cheng, P. C., M. L. Dykstra, et al. (1999). "A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting." J Exp Med **190**(11): 1549-60.
- Cheong, K. H., D. Zacchetti, et al. (1999). "VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6241-8.
- Cinek, T. and V. Horejsi (1992). "The nature of large noncovalent complexes containing glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases." J Immunol **149**(7): 2262-70.
- Crispe, I. N. and M. J. Bevan (1987). "Expression and functional significance of the J11d marker on mouse thymocytes." J Immunol **138**(7): 2013-8.
- Davis, C. B., I. Dikic, et al. (1997). "Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5." J Exp Med **186**(10): 1793-8.
- De Angelis, D. A., G. Miesenbock, et al. (1998). "PRIM: proximity imaging of green fluorescent protein-tagged polypeptides." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12312-6.
- Droz, D., N. Diebold, et al. (1990). "Deduction from Wilms' tumour that glomerular podocytes produce the basement membrane material bearing Goodpasture determinants." J Pathol **162**(4): 323-7.
- Droz, D., M. M. Rousseau, et al. (1990). "Cell differentiation in Wilms' tumor (nephroblastoma): an immunohistochemical study." Hum Pathol **21**(5): 536-44.
- Droz, D., D. Zachar, et al. (1990). "Expression of the human nephron differentiation molecules in renal cell carcinomas." Am J Pathol **137**(4): 895-905.

-
- Duronio, V., M. P. Scheid, et al. (1998). "Downstream signalling events regulated by phosphatidylinositol 3-kinase activity." Cell Signal **10**(4): 233-9.
- Eddidin, M. (1997). "Lipid microdomains in cell surface membranes." Curr Opin Struct Biol **7**(4): 528-32.
- Farrar, J. J., J. Fuller-Farrar, et al. (1980). "Thymoma production of T cell growth factor (Interleukin 2)." J Immunol **125**(6): 2555-8.
- Field, K. A., D. Holowka, et al. (1997). "Compartmentalized activation of the high affinity immunoglobulin E receptor within membrane domains." J Biol Chem **272**(7): 4276-80.
- Field, K. A., D. Holowka, et al. (1999). "Structural aspects of the association of FcepsilonRI with detergent-resistant membranes." J Biol Chem **274**(3): 1753-8.
- Fischer, G. F., O. Majdic, et al. (1990). "Signal transduction in lymphocytic and myeloid cells via CD24, a new member of phosphoinositol-anchored membrane molecules." J Immunol **144**(2): 638-41.
- Fivaz, M., L. Abrami, et al. (1999). "Landing on lipid rafts [letter; comment]." Trends Cell Biol **9**(6): 212-3.
- Fogel, M., P. Altevogt, et al. (1983). "Metastatic potential severely altered by changes in tumor cell adhesiveness and cell-surface sialylation." J Exp Med **157**(1): 371-6.
- Fogel, M., J. Friederichs, et al. (1999). "CD24 is a marker for human breast carcinoma." Cancer Lett **143**(1): 87-94.
- Fra, A. M., E. Williamson, et al. (1994). "Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae." J Biol Chem **269**(49): 30745-8.
- Friedlander, M., P. C. Brooks, et al. (1995). "Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins." Science **270**(5241): 1500-2.
- Friedrichson, T. and T. V. Kurzchalia (1998). "Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking." Nature **394**(6695): 802-5.
- Fujimoto, T. (1996). "GPI-anchored proteins, glycosphingolipids, and sphingomyelin are sequestered to caveolae only after crosslinking." J Histochem Cytochem **44**(8): 929-41.
- Gahmberg, C. G. (1997). "Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules." Curr Opin Cell Biol **9**(5): 643-50.
- Ganju, R. K., S. A. Brubaker, et al. (1998). "The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways." J Biol Chem **273**(36): 23169-75.
- Gehlsen, K. R., G. E. Davis, et al. (1992). "Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastatic properties." Clin Exp Metastasis **10**(2): 111-20.

-
- Geiger, C., W. Nagel, et al. (2000). "Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1." Embo J **19**(11): 2525-36.
- Grabovsky, V., S. Feigelson, et al. (2000). "Subsecond Induction of alpha4 Integrin Clustering by Immobilized Chemokines Stimulates Leukocyte Tethering and Rolling on Endothelial Vascular Cell Adhesion Molecule 1 under Flow Conditions." J Exp Med **192**(4): 495-506.
- Green, J. M., A. Zhelesnyak, et al. (1999). "Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving alphavbeta3, integrin-associated protein (CD47), and heterotrimeric G proteins." J Cell Biol **146**(3): 673-82.
- Hahne, M., R. H. Wenger, et al. (1994). "The heat-stable antigen can alter very late antigen 4-mediated adhesion." J Exp Med **179**(4): 1391-5.
- Hanada, K., M. Nishijima, et al. (1995). "Both sphingolipids and cholesterol participate in the detergent insolubility of alkaline phosphatase, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in mammalian membranes." J Biol Chem **270**(11): 6254-60.
- Harder, T., P. Scheiffele, et al. (1998). "Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components." J Cell Biol **141**(4): 929-42.
- Harder, T. and K. Simons (1997). "Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains." Curr Opin Cell Biol **9**(4): 534-42.
- Harder, T. and K. Simons (1999). "Clusters of glycolipid and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in lymphoid cells: accumulation of actin regulated by local tyrosine phosphorylation." Eur J Immunol **29**(2): 556-62.
- Hato, T., N. Pampori, et al. (1998). "Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling functions of integrin alphaIIb beta3." J Cell Biol **141**(7): 1685-95.
- Havran, W. L., M. Poenie, et al. (1987). "Expression and function of the CD3-antigen receptor on murine CD4+8+ thymocytes." Nature **330**(6144): 170-3.
- Hemler, M. E. (1988). "Adhesive protein receptors on hematopoietic cells." Immunol Today **9**(4): 109-13.
- Hmama, Z., K. L. Knutson, et al. (1999). "Monocyte adherence induced by lipopolysaccharide involves CD14, LFA-1, and cytohesin-1. Regulation by Rho and phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem **274**(2): 1050-7.
- Holzmann, B., B. W. McIntyre, et al. (1989). "Identification of a murine Peyer's patch-specific lymphocyte homing receptor as an integrin molecule with an alpha chain homologous to human VLA-4 alpha." Cell **56**(1): 37-46.
- Hooper, N. M. (1997). "Glycosyl-phosphatidylinositol anchored membrane enzymes." Clin Chim Acta **266**(1): 3-12.

-
- Hooshmand-Rad, R., L. Claesson-Welsh, et al. (1997). "Involvement of phosphatidylinositol 3'-kinase and Rac in platelet- derived growth factor-induced actin reorganization and chemotaxis." Exp Cell Res **234**(2): 434-41.
- Howell, K. E., U. Reuter-Carlson, et al. (1987). "One antigen, one gold? A quantitative analysis of immunogold labeling of plasma membrane 5'-nucleotidase in frozen thin sections." Eur J Cell Biol **44**(2): 318-27.
- Huang, C., Q. Zang, et al. (2000). "Structural and functional studies with antibodies to the integrin beta 2 subunit. A model for the I-like domain." J Biol Chem **275**(28): 21514-24.
- Huang, L. R. and H. C. Hsu (1995). "Cloning and expression of CD24 gene in human hepatocellular carcinoma: a potential early tumor marker gene correlates with p53 mutation and tumor differentiation." Cancer Res **55**(20): 4717-21
- Hubbe, M. and P. Altevogt (1994). "Heat-stable antigen/CD24 on mouse T lymphocytes: evidence for a costimulatory function." Eur J Immunol **24**(3): 731-7.
- Humphries, M. J. (1990). "The molecular basis and specificity of integrin-ligand interactions." J Cell Sci **97**(Pt 4): 585-92.
- Humphries, M. J. and P. Newham (1998). "The structure of cell-adhesion molecules." Trends Cell Biol **8**(2): 78-83.
- Huth, J. R., E. T. Olejniczak, et al. (2000). "NMR and mutagenesis evidence for an I domain allosteric site that regulates lymphocyte function-associated antigen 1 ligand binding." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5231-6.
- Hynes, R. O. (1987). "Integrins: a family of cell surface receptors." Cell **48**(4): 549-54.
- Ikonen, E., M. Tagaya, et al. (1995). "Different requirements for NSF, SNAP, and Rab proteins in apical and basolateral transport in MDCK cells." Cell **81**(4): 571-80.
- Ilangumaran, S., H. T. He, et al. (2000). "Microdomains in lymphocyte signalling: beyond GPI-anchored proteins." Immunol Today **21**(1): 2-7.
- Inoue, H., H. Nojima, et al. (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." Gene **96**(1): 23-8.
- Jackson, D., R. Waibel, et al. (1992). "CD24, a signal-transducing molecule expressed on human B cells, is a major surface antigen on small cell lung carcinomas." Cancer Res **52**(19): 5264-70.
- Jacobs, T., A. Darji, et al. (1998). "Listeriolysin O: cholesterol inhibits cytolysis but not binding to cellular membranes." Mol Microbiol **28**(6): 1081-9.
- Jacobson, K. and C. Dietrich (1999). "Looking at lipid rafts? [In Process Citation]." Trends Cell Biol **9**(3): 87-91.

-
- Janes, P. W., S. C. Ley, et al. (1999). "Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor." J Cell Biol **147**(2): 447-61.
- Janes, P. W., S. C. Ley, et al. (2000). "The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling." Semin Immunol **12**(1): 23-34.
- Johnston, B., T. B. Issekutz, et al. (1996). "The alpha 4-integrin supports leukocyte rolling and adhesion in chronically inflamed postcapillary venules in vivo." J Exp Med **183**(5): 1995-2006.
- Jones, P. H., L. A. Bishop, et al. (1996). "Functional significance of CD9 association with beta 1 integrins in human epidermal keratinocytes." Cell Adhes Commun **4**(4-5): 297-305.
- Jones, S. M. and K. E. Howell (1997). "Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the formation of constitutive transport vesicles from the TGN." J Cell Biol **139**(2): 339-49.
- Kadmon, G., M. Eckert, et al. (1992). "Nectadrin, the heat-stable antigen, is a cell adhesion molecule." J Cell Biol **118**(5): 1245-58.
- Kadmon, G., B. u. H. F. von, et al. (1995). "Evidence for cis interaction and cooperative signalling by the heat-stable antigen nectadrin (murine CD24) and the cell adhesion molecule L1 in neurons." Eur J Neurosci **7**(5): 993-1004.
- Kadmon, G., B. u. H. F. von, et al. (1994). "Differential, LFA-1-sensitive effects of antibodies to nectadrin, the heat-stable antigen, on B lymphoblast aggregation and signal transduction." Biochem Biophys Res Commun **198**(3): 1209-15.
- Karran, L., M. Jones, et al. (1995). "Expression of a B-cell marker, CD24, on nasopharyngeal carcinoma cells." Int J Cancer **60**(4): 562-6.
- Kay, R., F. Takei, et al. (1990). "Expression cloning of a cDNA encoding M1/69-J11d heat-stable antigens." J Immunol **145**(6): 1952-9.
- Keller, P. and K. Simons (1998). "Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin." J Cell Biol **140**(6): 1357-67.
- Kenworthy, A. K., N. Petranova, et al. (2000). "High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI- anchored proteins in cell plasma membranes." Mol Biol Cell **11**(5): 1645-55.
- Kilger, G., L. A. Needham, et al. (1995). "Differential regulation of alpha 4 integrin-dependent binding to domains 1 and 4 of vascular cell adhesion molecule-1." J Biol Chem **270**(11): 5979-84.
- Kim, T., K. Fiedler, et al. (1995). "Cloning and characterization of MVP17: a developmentally regulated myelin protein in oligodendrocytes." J Neurosci Res **42**(3): 413-22.

-
- Kishimoto, T. K., M. A. Jutila, et al. (1990). "Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(6): 2244-8.
- Klein, L., T. Klein, et al. (1998). "CD4 T cell tolerance to human C-reactive protein, an inducible serum protein, is mediated by medullary thymic epithelium." J Exp Med **188**(1): 5-16.
- Klein, T. C., R. Doffinger, et al. (1995). "Tolerance and immunity to the inducible self antigen C-reactive protein in transgenic mice." Eur J Immunol **25**(12): 3489-95.
- Knorr, R. and M. L. Dustin (1997). "The lymphocyte function-associated antigen 1 I domain is a transient binding module for intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and ICAM-3 in hydrodynamic flow." J Exp Med **186**(5): 719-30.
- Knorr, T., W. Nagel, et al. (2000). "Phosphoinositides determine specificity of the guanine-nucleotide exchange activity of cytohesin-1 for ADP-ribosylation factors derived from a mammalian expression system." Eur J Biochem **267**(12): 3784-91.
- Kobayashi, T. and J. M. Robinson (1991). "A novel intracellular compartment with unusual secretory properties in human neutrophils." J Cell Biol **113**(4): 743-56.
- Kolanus, W., W. Nagel, et al. (1996). "Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule." Cell **86**(2): 233-42.
- Kolanus, W. and B. Seed (1997). "Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3." Curr Opin Cell Biol **9**(5): 725-31.
- Kurnick, J. T., P. Altevogt, et al. (1980). "Long-term maintenance of HLA-D restricted T cells specific for soluble antigens." Scand J Immunol **11**(2): 131-6.
- Kurzchalia, T. V., Hartmann, E. and Dupree, P. (1995). "Guilt by insolubility - does a protein's detergent insolubility reflect caveolar location?" Trends Cell Biol **5**: 187-189.
- Kurzchalia, T. V. and R. G. Parton (1999). "Membrane microdomains and caveolae." Curr Opin Cell Biol **11**(4): 424-31.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.
- Landis, R. C., A. McDowall, et al. (1994). "Involvement of the "I" domain of LFA-1 in selective binding to ligands ICAM-1 and ICAM-3." J Cell Biol **126**(2): 529-37.
- Lang, M. L., L. Shen, et al. (1999). "Gamma-chain dependent recruitment of tyrosine kinases to membrane rafts by the human IgA receptor Fc alpha R." J Immunol **163**(10): 5391-8.
- Latker, C. H., N. L. Shinowara, et al. (1987). "Differential localization of alkaline phosphatase in barrier tissues of the frog and rat nervous systems: a cytochemical and

-
- biochemical study [published erratum appears in *J Comp Neurol* 1988 Mar 8;269(2):313].” *J Comp Neurol* **264**(3): 291-302.
- Lauffenburger, D. A. and A. F. Horwitz (1996). “Cell migration: a physically integrated molecular process.” *Cell* **84**(3): 359-69.
- Lawrence, M. B. and T. A. Springer (1991). “Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins.” *Cell* **65**(5): 859-73.
- Ledbetter, J. A. and L. A. Herzenberg (1979). “Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens.” *Immunol Rev* **47**: 63-90.
- Leitinger, B. and N. Hogg (1999). “Integrin I domains and their function.” *Biochem Soc Trans* **27**(6): 826-32.
- Leitinger, B. and N. Hogg (2000). “Effects of I domain deletion on the function of the beta2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1.” *Mol Biol Cell* **11**(2): 677-90.
- Leitinger, B. and N. Hogg (2000). “From crystal clear ligand binding to designer I domains [comment] [news].” *Nat Struct Biol* **7**(8): 614-6.
- Li, X., D. Hunter, et al. (1998). “A calcium-dependent tyrosine kinase splice variant in human monocytes. Activation by a two-stage process involving adherence and a subsequent intracellular signal.” *J Biol Chem* **273**(16): 9361-4.
- Lin, J., A. Weiss, et al. (1999). “Localization of LAT in glycolipid-enriched microdomains is required for T cell activation.” *J Biol Chem* **274**(41): 28861-4.
- Lisanti, M. P., I. W. Caras, et al. (1989). “A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells.” *J Cell Biol* **109**(5): 2145-56.
- Liu, L., P. Moesner, et al. (1999). “Integrin-dependent leukocyte adhesion involves geranylgeranylated protein(s).” *J Biol Chem* **274**(47): 33334-40.
- Liu, S. and M. H. Ginsberg (2000). “Paxillin binding to a conserved sequence motif in the alpha 4 integrin cytoplasmic domain.” *J Biol Chem* **275**(30): 22736-42.
- Liu, S., S. M. Thomas, et al. (1999). “Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses.” *Nature* **402**(6762): 676-81.
- Liu, Y., B. Jones, et al. (1992). “Co-stimulation of murine CD4 T cell growth: cooperation between B7 and heat-stable antigen [published erratum appears in *Eur J Immunol* 1993 Mar;23(3):780].” *Eur J Immunol* **22**(11): 2855-9.
- Liu, Y., R. H. Wenger, et al. (1997). “Distinct costimulatory molecules are required for the induction of effector and memory cytotoxic T lymphocytes.” *J Exp Med* **185**(2): 251-62.

-
- Lorence, A., A. Darszon, et al. (1997). "Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes." FEBS Lett **414**(2): 303-7.
- Machleidt, T., W. P. Li, et al. (2000). "Multiple domains in caveolin-1 control its intracellular traffic." J Cell Biol **148**(1): 17-28.
- Manes, S., E. Mira, et al. (1999). "Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells." Embo J **18**(22): 6211-20.
- Mannion, B. A., F. Berditchevski, et al. (1996). "Transmembrane-4 superfamily proteins CD81 (TAPA-1), CD82, CD63, and CD53 specifically associated with integrin alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29)." J Immunol **157**(5): 2039-47.
- Martens, J. R., R. Navarro-Polanco, et al. (2000). "Differential targeting of Shaker-like potassium channels to lipid rafts." J Biol Chem **275**(11): 7443-6.
- Martin-Belmonte, F., L. Kremer, et al. (1998). "Expression of the MAL gene in the thyroid: the MAL proteolipid, a component of glycolipid-enriched membranes, is apically distributed in thyroid follicles." Endocrinology **139**(4): 2077-84.
- Matsuura, S., S. Eto, et al. (1984). "Ferritin immunoelectron microscopic localization of 5'-nucleotidase on rat liver cell surface." J Cell Biol **99**(1 Pt 1): 166-73.
- Matter, K. and I. Mellman (1994). "Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells." Curr Opin Cell Biol **6**(4): 545-54.
- Mayor, S. and F. R. Maxfield (1995). "Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment." Mol Biol Cell **6**(7): 929-44.
- Mayor, S., K. G. Rothberg, et al. (1994). "Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking." Science **264**(5167): 1948-51.
- McDowall, A., B. Leitinger, et al. (1998). "The I domain of integrin leukocyte function-associated antigen-1 is involved in a conformational change leading to high affinity binding to ligand intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)." J Biol Chem **273**(42): 27396-403.
- Melkonian, K. A., A. G. Ostermeyer, et al. (1999). "Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated." J Biol Chem **274**(6): 3910-7.
- Miyake, K., I. L. Weissman, et al. (1991). "Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis." J Exp Med **173**(3): 599-607.
- Monks, C. R., H. Kupfer, et al. (1997). "Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation." Nature **385**(6611): 83-6.
- Montecucco, C., E. Papini, et al. (1994). "Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism." FEBS Lett **346**(1): 92-8.

-
- Montixi, C., C. Langlet, et al. (1998). "Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains." Embo J **17**(18): 5334-48.
- Mukherjee, S., T. T. Soe, et al. (1999). "Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails." J Cell Biol **144**(6): 1271-84.
- Muniz, M. and H. Riezman (2000). "Intracellular transport of GPI-anchored proteins." Embo J **19**(1): 10-5.
- Musch, A., H. Xu, et al. (1996). "Transport of vesicular stomatitis virus G protein to the cell surface is signal mediated in polarized and nonpolarized cells." J Cell Biol **133**(3): 543-58.
- Nagel, W., L. Zeitlmann, et al. (1998). "Phosphoinositide 3-OH kinase activates the beta2 integrin adhesion pathway and induces membrane recruitment of cytohesin-1." J Biol Chem **273**(24): 14853-61.
- Neeson, P. J., P. J. Thurlow, et al. (2000). "Characterization of activated lymphocyte-tumor cell adhesion." J Leukoc Biol **67**(6): 847-55.
- Nelson, K. L., S. M. Raja, et al. (1997). "The glycosylphosphatidylinositol-anchored surface glycoprotein Thy-1 is a receptor for the channel-forming toxin aerolysin." J Biol Chem **272**(18): 12170-4.
- Nielsen, P. J., B. Lorenz, et al. (1997). "Altered erythrocytes and a leaky block in B-cell development in CD24/HSA-deficient mice." Blood **89**(3): 1058-67.
- Pardi, R., L. Inverardi, et al. (1992). "Regulatory mechanisms in leukocyte adhesion: flexible receptors for sophisticated travelers [see comments]." Immunol Today **13**(6): 224-30.
- Parkin, E. T., A. J. Turner, et al. (1999). "Amyloid precursor protein, although partially detergent-insoluble in mouse cerebral cortex, behaves as an atypical lipid raft protein." Biochem J **344 Pt 1**: 23-30.
- Parks, D. R. and L. A. Herzenberg (1984). "Fluorescence-activated cell sorting: theory, experimental optimization, and applications in lymphoid cell biology." Methods Enzymol **108**: 197-241.
- Parton, R. G. (1994). "Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae." J Histochem Cytochem **42**(2): 155-66.
- Parton, R. G. and K. Simons (1995). "Digging into caveolae [comment]." Science **269**(5229): 1398-9.
- Peled, A., V. Grabovsky, et al. (1999). "The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow." J Clin Invest **104**(9): 1199-211.
- Penninger, J. M. and G. R. Crabtree (1999). "The actin cytoskeleton and lymphocyte activation." Cell **96**(1): 9-12.

-
- Perschl, A., J. Lesley, et al. (1995). "Transmembrane domain of CD44 is required for its detergent insolubility in fibroblasts." J Cell Sci **108**(Pt 3): 1033-41.
- Polyak, M. J., S. H. Taylor, et al. (1998). "Identification of a cytoplasmic region of CD20 required for its redistribution to a detergent-insoluble membrane compartment." J Immunol **161**(7): 3242-8.
- Pralle, A., P. Keller, et al. (2000). "Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells." J Cell Biol **148**(5): 997-1008.
- Prieto, J., F. Takei, et al. (1989). "MALA-2, mouse homologue of human adhesion molecule ICAM-1 (CD54)." Eur J Immunol **19**(9): 1551-7.
- Puertollano, R. and M. A. Alonso (1998). "A short peptide motif at the carboxyl terminus is required for incorporation of the integral membrane MAL protein to glycolipid-enriched membranes." J Biol Chem **273**(21): 12740-5.
- Rapraeger, A. C. and V. L. Ott (1998). "Molecular interactions of the syndecan core proteins." Curr Opin Cell Biol **10**(5): 620-8.
- Ravetch, J. V. and R. A. Clynes (1998). "Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo." Annu Rev Immunol **16**: 421-32.
- Ren, J., S. Lew, et al. (1999). "Control of the transmembrane orientation and interhelical interactions within membranes by hydrophobic helix length." Biochemistry **38**(18): 5905-12.
- Ren, J., S. Lew, et al. (1997). "Transmembrane orientation of hydrophobic alpha-helices is regulated both by the relationship of helix length to bilayer thickness and by the cholesterol concentration." Biochemistry **36**(33): 10213-20.
- Rietveld, A. and K. Simons (1998). "The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts." Biochim Biophys Acta **1376**(3): 467-79.
- Robinson, P. J. (1991). "Phosphatidylinositol membrane anchors and T-cell activation." Immunol Today **12**(1): 35-41.
- Rodgers, W. and J. K. Rose (1996). "Exclusion of CD45 inhibits activity of p56lck associated with glycolipid-enriched membrane domains." J Cell Biol **135**(6 Pt 1): 1515-23.
- Rodriguez-Boulan, E. and A. Gonzalez (1999). "Glycans in post-Golgi apical targeting: sorting signals or structural props?" Trends Cell Biol **9**(8): 291-4.
- Rodriguez-Boulan, E. and W. J. Nelson (1989). "Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype." Science **245**(4919): 718-25.
- Rothberg, K. G., Y. S. Ying, et al. (1990). "Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate." J Cell Biol **111**(6 Pt 2): 2931-8.

-
- Rothlein, R. and T. A. Springer (1986). "The requirement for lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic leukocyte adhesion stimulated by phorbol ester." J Exp Med **163**(5): 1132-49.
- Rougon, G., L. A. Alterman, et al. (1991). "The murine heat-stable antigen: a differentiation antigen expressed in both the hematolymphoid and neural cell lineages." Eur J Immunol **21**(6): 1397-402.
- Ruiz, P., M. V. Wiles, et al. (1995). "Alpha 6 integrins participate in pro-T cell homing to the thymus." Eur J Immunol **25**(7): 2034-41.
- Ruppert, M., S. Aigner, et al. (1995). "The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5." J Cell Biol **131**(6 Pt 2): 1881-91.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- Salomon, D. R., L. Crisa, et al. (1997). "Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion. Implications for the function of alpha4beta1 (VLA4) integrin in T-cell development." Blood **89**(7): 2461-71.
- Sammar, M., S. Aigner, et al. (1994). "Heat-stable antigen (CD24) as ligand for mouse P-selectin." Int Immunol **6**(7): 1027-36.
- Sammar, M., E. Gulbins, et al. (1997). "Mouse CD24 as a signaling molecule for integrin-mediated cell binding: functional and physical association with src-kinases." Biochem Biophys Res Commun **234**(2): 330-4.
- Sanchez-Madrid, F., P. Simon, et al. (1983). "Mapping of antigenic and functional epitopes on the alpha- and beta- subunits of two related mouse glycoproteins involved in cell interactions, LFA-1 and Mac-1." J Exp Med **158**(2): 586-602.
- Sanchez-Madrid, F. a. d. P., M. A. (1999). Embo J **18**: 501-511.
- Sarmiento, M., D. P. Dialynas, et al. (1982). "Cloned T lymphocytes and monoclonal antibodies as probes for cell surface molecules active in T cell-mediated cytotoxicity." Immunol Rev **68**: 135-69.
- Scheiffele, P., M. G. Roth, et al. (1997). "Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain." Embo J **16**(18): 5501-8.
- Schirmacher, V. (1979). "Tumor metastases and cell-mediated immunity in a model system in DBA/2 mice. V. Transfer of protective immunity with H-2 identical immune T cells from B10.D2 mice." Int J Cancer **24**(1): 80-6.
- Schirmacher, V., R. Dzarlieva, et al. (1983). "Phenotypic and genotypic differences between high- and low-metastatic related tumor lines and the problem of tumor progression and variant generation." Symp Fundam Cancer Res **36**: 81-99.

-
- Schroeder, R. J., S. N. Ahmed, et al. (1998). "Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains." J Biol Chem **273**(2): 1150-7.
- Schwab, W., M. Kasper, et al. (2000). "Characterization of caveolins from human knee joint cartilage: expression of caveolin-1, -2, and -3 in chondrocytes and association with integrin beta1." Histochem Cell Biol **113**(3): 221-5.
- Shapiro, A. L., E. Vinuela, et al. (1967). "Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels." Biochem Biophys Res Commun **28**(5): 815-20.
- Sheets, E. D., D. Holowka, et al. (1999). "Critical role for cholesterol in Lyn-mediated tyrosine phosphorylation of FcepsilonRI and their association with detergent-resistant membranes." J Cell Biol **145**(4): 877-87.
- Shirasawa, T., T. Akashi, et al. (1993). "Gene expression of CD24 core peptide molecule in developing brain and developing non-neural tissues." Dev Dyn **198**(1): 1-13.
- Sigal, A., D. A. Bleijs, et al. (2000). "The LFA-1 integrin supports rolling adhesions on ICAM-1 under physiological shear flow in a permissive cellular environment." J Immunol **165**(1): 442-52.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-72.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**(23): 720-31.
- Skibbens, J. E., M. G. Roth, et al. (1989). "Differential extractability of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and nonpolar fibroblasts." J Cell Biol **108**(3): 821-32.
- Smart, E. J., G. A. Graf, et al. (1999). "Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction." Mol Cell Biol **19**(11): 7289-304.
- Springer, T., G. Galfre, et al. (1978). "Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: identification of novel leukocyte differentiation antigens." Eur J Immunol **8**(8): 539-51.
- Springer, T. A. (1990). "Adhesion receptors of the immune system." Nature **346**(6283): 425-34.
- Stewart, M. and N. Hogg (1996). "Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity." J Cell Biochem **61**(4): 554-61.
- Stewart, M. P., C. Cabanas, et al. (1996). "T cell adhesion to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is controlled by cell spreading and the activation of integrin LFA-1." J Immunol **156**(5): 1810-7.

-
- Stewart, M. P., A. McDowall, et al. (1998). "LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by a Ca²⁺-dependent protease, calpain." J Cell Biol **140**(3): 699-707.
- Stulnig, T. M., M. Berger, et al. (1997). "Signal transduction via glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins in T cells is inhibited by lowering cellular cholesterol." J Biol Chem **272**(31): 19242-7.
- Tachibana, I., J. Bodorova, et al. (1997). "NAG-2, a novel transmembrane-4 superfamily (TM4SF) protein that complexes with integrins and other TM4SF proteins." J Biol Chem **272**(46): 29181-9.
- Takei, F., D. S. Secher, et al. (1981). "Use of a monoclonal antibody specifically non-reactive with T cells to delineate lymphocyte subpopulations." Immunology **42**(3): 371-8.
- Tobey, R. A. and E. W. Campbell (1965). "Mengovirus replication. 3. Virus reproduction in Chinese hamster ovary cells." Virology **27**(1): 11-6.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Ulevitch, R. J. and P. S. Tobias (1994). "Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling." Curr Opin Immunol **6**(1): 125-30.
- van den Berg, C. W., T. Cinek, et al. (1995). "Exogenous glycosyl phosphatidylinositol-anchored CD59 associates with kinases in membrane clusters on U937 cells and becomes Ca(2+)-signaling competent." J Cell Biol **131**(3): 669-77.
- van Kooyk, Y., S. J. van Vliet, et al. (1999). "The actin cytoskeleton regulates LFA-1 ligand binding through avidity rather than affinity changes." J Biol Chem **274**(38): 26869-77.
- Varma, R. and S. Mayor (1998). "GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface." Nature **394**(6695): 798-801.
- Viola, A., S. Schroeder, et al. (1999). "T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains [see comments]." Science **283**(5402): 680-2.
- Wandinger-Ness, A., M. K. Bennett, et al. (1990). "Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells." J Cell Biol **111**(3): 987-1000.
- Wary, K. K., F. Mainiero, et al. (1996). "The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression." Cell **87**(4): 733-43.
- Weimbs, T., S. H. Low, et al. (1997). "A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3046-51.

-
- Wenger, R. H., M. Ayane, et al. (1991). "The genes for a mouse hematopoietic differentiation marker called the heat-stable antigen." Eur J Immunol **21**(4): 1039-46.
- Wenger, R. H., J. M. Rochelle, et al. (1993). "The heat stable antigen (mouse CD24) gene is differentially regulated but has a housekeeping promoter." J Biol Chem **268**(31): 23345-52.
- Woods, A. and J. R. Couchman (2000). "Integrin modulation by lateral association [In Process Citation]." J Biol Chem **275**(32): 24233-6.
- Xavier, R., T. Brennan, et al. (1998). "Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation." Immunity **8**(6): 723-32.
- Xavier, R. and B. Seed (1999). "Membrane compartmentation and the response to antigen." Curr Opin Immunol **11**(3): 265-9.
- Yauch, R. L., D. P. Felsenfeld, et al. (1997). "Mutational evidence for control of cell adhesion through integrin diffusion/clustering, independent of ligand binding." J Exp Med **186**(8): 1347-55.
- Yip, P. M., X. Zhao, et al. (1998). "The Arg-Gly-Asp motif in the cell adhesion molecule L1 promotes neurite outgrowth via interaction with the alphavbeta3 integrin." Mol Biol Cell **9**(2): 277-90.
- Yoshimori, T., P. Keller, et al. (1996). "Different biosynthetic transport routes to the plasma membrane in BHK and CHO cells." J Cell Biol **133**(2): 247-56.
- Zacchetti, D., J. Peranen, et al. (1995). "VIP17/MAL, a proteolipid in apical transport vesicles." FEBS Lett **377**(3): 465-9.
- Zang, Q., C. Lu, et al. (2000). "The top of the inserted-like domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen-1 beta subunit contacts the alpha subunit beta-propeller domain near beta-sheet 3." J Biol Chem **275**(29): 22202-12.
- Zauli, G., A. Bassini, et al. (1997). "Thrombopoietin enhances the alpha IIb beta 3-dependent adhesion of megakaryocytic cells to fibrinogen or fibronectin through PI 3 kinase." Blood **89**(3): 883-95.
- Zeller, Y., J. Lohr, et al. (1998). "Asp-698 and Asp-811 of the integrin alpha4-subunit are critical for the formation of a functional heterodimer." J Biol Chem **273**(12): 6786-95.
- Zhang, W., R. P. Tribble, et al. (1998). "LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation." Immunity **9**(2): 239-46.
- Zitzer, A., O. Zitzer, et al. (1999). "Oligomerization of *Vibrio cholerae* cytolysin yields a pentameric pore and has a dual specificity for cholesterol and sphingolipids in the target membrane." J Biol Chem **274**(3): 1375-80.

G. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

β-ME	Beta-Mercaptoethanol
°C	Grad Celsius
μ	mikro
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2-Azino-di-[3-ethylbenzylthiazolinsulfat]
Ag	Antigen
APP	amyloid precursor protein (amyloides Vorläuferprotein)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BOG	N-Octyl-β-D-Glucopyranosid
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserum-Albumin)
CD	Cluster of differentiation (Differenzierungsantigen)
cDNA	complement DNA (komplementäre DNA)
ConA	Concanavalin A
CT _x	Cholera Toxin
CT _x -B	Cholera Toxin B-Untereinheit
DIG	detergent-insoluble glycosphingolipid enriched membranemicrodomains (Detergens-unlösliche, Glykosphingolipid-angereicherte Membranmikrodomänen)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence (verstärkte Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
F	Farad
FACS	Fluorescence activated cell sorter (Durchflußzytometrie)

FAK	Focal adhesion kinase (Fokale Adhäsionskinase)
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinthiocyanat
g	Gramm
G _{M1}	Gangliosid M1
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HBSS	Hanks's buffered salt solution (Hank's gepufferte Salzlösung)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethanol-Sulfonsäure
HMG-CoA	Hydroxymehtylglutaryl-CoenzymA
HRP	Horseradishperoxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HSA	Heat stable-antigen (hitzestabiles Antigen)
ICAM-1, -2, -3	Intrazelluläres Zelladhäsionsmolekül-1, -2, -3
Ig	Immunglobulin
kD	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth
LFA-1	Leukocyte Function Antigen-1 (Leukozytenfunktions-Antigen-1)
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
MCD	Methyl-β-Cyclodextrin
MIDAS	metal ion-dependent adhesion site (Metallionen-abhängige Bindungsstelle)
Min	Minute
n	Anzahl
NP-40	Nonidet-40
o. D.	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
pH	-log [H ⁺]

PI3-Kinase	Phosphoinositol-Kinase 3
PI-PLC	Phosphoinositolspezifische Phospholipase C
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbolmyristataacetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Zellkulturmedium (Gibco BRL)
RT	Raumtemperatur
sCD24	lösliches CD24
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N', N', -Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethylamino)-methan
TX 100	Triton X-100
U	Unit (Einheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCAM	Vascular cell adhesion molecule (Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül)
VLA	Very late activation antigen (sehr spätes Aktivierungsantigen)
W	Watt
x g	Zentrifugalkraft

2. Publikationsliste:

- 1) Sammar, M., Gulbins., E., **Hilbert, K.**, Lang, F. and Altevogt, P. (1997). Mouse CD24 as a signaling molecule for integrin-mediated cell binding: functional and physical association with src-kinases. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 234, 330 – 334
- 2) **Krauss, K.** and Altevogt, P. (1999). Integrin-leukocyte function-associated antigen-1-mediated cell binding can be activated by clustering of membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 274 (52):36921 – 36927
- 3) Gutwein, P., Oleszewski, M., Mechtersheimer, S., Agmon-Levin, N., **Krauss, K.** and Altevogt, P., (2000). Role of src-kinases in the ADAM mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. *J. Biol. Chem.* 275 (20): 15490 - 15497

3. Lebenslauf:

Name: Kerstin Krauß, geb. Hilbert
Adresse: Turnstr. 11,
67308 Lautersheim
Tel.: 06351/37945
e-mail: K.Krauss@gmx.de
Geb.: 13.11.1972 in Grünstadt
Familienstand: verheiratet

Ausbildung:

1979 – 1983 **Grundschule** Göllheim

1983 – 1992 **Gymnasium** Weierhof,
Abschluß: Abitur

1992 – 1997 **Studium** der Biologie an der Universität Kaiserslautern

Jul. 1997 Diplomprüfung in Biologie,
Prüfungsfächer: Humanbiologie, Biochemie, Zellbiologie, Zoologie

Nov.1996 – Jul. 1997 **Diplomarbeit** am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg
am Forschungsschwerpunkt Tumorummunologie, in der Abteilung
Zelluläre Immunologie von Herrn Prof. Dr. Volker Schirmacher,
unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Altevogt
Thema: Der Signalweg von GPI-geankerten Molekülen am Beispiel
von HSA/Maus CD24

seit Okt. 1997 **Promotion** am Deutschen Krebsforschungszentrum in der o. g.
Abteilung
Thema: Die Rolle von Membranmikrodomänen und des GPI-
geankerten Moleküls CD24 bei der Regulation der Zelladhäsion

4. Erklärung:

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Lautersheim, den 19.09.2000

Kerstin Krauß